

**STUDIEN ÜBER DIE KONGENITALE GLYKOGEN-
SPEICHERKRANKHEIT VOM TYP II
(MORBUS POMPE)**

Axel A. von Rücker

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0028

Aus der
Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. K. Betke

STUDIEN ÜBER DIE KONGENITALE GLYKOGENSPEICHERKRANKHEIT
VOM TYP II (MORBUS POMPE)

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Dr. Axel A. von Rücker
aus München
1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: P.D. Dr. J. Schaub
Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1980



Mein herzlichster Dank gilt allen, die mir mit Rat
und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr.
K. Betke für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit,
und Herrn PD Dr. J. Schaub für die fruchtbare Zusammen-
arbeit. Ferner gilt mein besonderer Dank Dr. M. F.
Niermeijer von der Erasmus Universität Rotterdam für
das Überlassen von Fibroblasten von Morbus Pompe
Patienten.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
2. ERGEBNISSE	5
2.1. Isolierung der sauren lysosomalen α -Glucosidase aus Humanleber	5
2.1.1. Herstellung eines Leberextrakts	5
2.1.2. Reinigung der lysosomalen α -Glucosidase mittels Gelfiltration	7
2.1.3. Isolierung von kleinen Mengen saurer α -Glucosidase	12
2.2. Charakterisierung der isolierten sauren lysosomalen α -Glucosidase aus Humanleber	13
2.2.1. Stabilität der α -Glucosidase	13
2.2.2. Elektrophoretische Eigenschaften	14
2.2.3. Sonstige Eigenschaften	20
2.3. Studien über die saure lysosomale α -Glucosidase von Fibroblasten mit Hilfe von Antikörpern gegen die isolierte saure lysosomale α -Glucosidase aus Humanleber	23
2.3.1. Antikörper gegen α -Glucosidase: Herstellungsverfahren	23
2.3.2. Verwendung von Antikörper gegen α -Glucosidase zur Untersuchung von <u>in vivo</u> radioaktiv markierter α -Glucosidase aus menschlichen Fibroblasten	23
2.3.3. Quantitative und qualitative Analyse des mit Antikörpern gegen α -Glucosidase immunopräzipitierten radioaktiven Materials	27
3. DISKUSSION	41

	Seite
4. ANMERKUNGEN ZUR METHODIK	49
4.1. Bestimmung der Aktivität der sauren lysosomalen α -Glucosidase	49
4.2. Gelfiltration	50
4.3. Herstellung eines Affinitätsharzes mit Turanose und Sepharose 6-B Gel	51
4.4. Polyacrylamid - Gelelektrophorese	52
4.5. Herstellung von Antikörpern gegen α -Glucosidase	54
4.6. Fibroblasten: Kulturbedingungen, radioaktiver Einbau	56
4.7. Aminosäureanalysen	57
4.8. Verwendete Materialien	58
5. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	59
6. LITERATURVERZEICHNIS	60

Zusammenfassung

1. Zwei Methoden zur Isolierung der lysosomalen sauren α -Glucosidase aus Humanleber werden beschrieben. Eine Methode beschreibt die Großdarstellung des Enzyms mit Hilfe von Cholat-Extraktion, Säure-Denaturierung, Ammoniumsulfat-Fällung, und Chromatographie auf Sephadex G-100 und Sephacryl S-200. Der Enzymanreicherungs-Faktor betrug etwa 2300, die Ausbeute 31%. Ferner wird ein weniger aufwendiges Isolierungsverfahren beschrieben, das sich beim Einsatz kleiner Lebermengen bewährt hat. Dieses bedarf nur einige Zentrifugations- und Dialyses Schritte vor Chromatographie auf Sephacryl S-200. Der Anreicherungs-faktor betrug auch hier ca. 2300, die Ausbeute lag bei 21%.
2. Einige Eigenschaften der isolierten sauren α -Glucosidase werden beschrieben u. a. die Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Protein- und Salzkonzentrationen, das pH-Optimum, die K_m für Maltose und 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranosid (MUF-Glu), die N-terminalen Aminosäuren, die Aminosäurezusammensetzung, die Aufspaltung der isolierten Enzympräparation in zwei Isoenzyme auf der Polyacrylamid-Elektrophorese und bei der Isoelektrofokussierung, und der limitierte Zerfall des Enzyms in Untereinheiten bei instabilen Bedingungen.
3. Mit Hilfe von Antikörpern gegen die isolierte saure α -Glucosidase und des Einsatzes eines neuen immunologischen Verfahrens (Protein A-Sepharose Cl 4 Gel) konnte saure α -Glucosidase aus Fibroblasten, die zuvor in vivo mit ^3H -Leucin radioaktiv markiert wurde, auf einer SDS-Gelelektrophorese analysiert werden. Dabei zeigte sich, daß die saure α -Glucosidase (MG: 104000) vielleicht nur aus einer Untereinheit mit einem scheinbaren Molekulargewicht von $13\ 000 \pm 2000$ aufgebaut ist.
4. Bei der Untersuchung in vivo radioaktiv markierter Fibroblasten von Patienten mit Morbus Pompe zeigte sich, daß diese Polypeptide herstellen, die von Antikörpern gegen saure α -Glucosidase präzipitiert werden. Diese Polypeptide besitzen auf der

SDS-Gelelektrophorese eine ähnliche Mobilität wie die immunopräzipitierten Untereinheiten der sauren α -Glucosidase aus Kontroll-Fibroblasten. In vivo-Experimente mit Fibroblasten zeigen ferner, daß diese Polypeptide beschleunigt eliminiert werden. Die Eliminationsgeschwindigkeit war bei den einzelnen Morbus Pompe-Varianten (adult, juvenil, infantil) unterschiedlich. Am schnellsten war sie bei den Fibroblasten von Patienten mit der infantilen Form von Morbus Pompe. Die unterschiedliche Eliminationsgeschwindigkeit als Ursache für die verschiedenen Manifestationsformen von Morbus Pompe wird diskutiert.

5. Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Morbus Pompe Typen (adulte, juvenile, infantile Pompe Varianten und heterozygote Formen) wird aufgezeigt. Die Anwendbarkeit dieser Methode bei anderen Stoffwechselkrankheiten wird diskutiert.

1. Einleitung

Die Glykogenspeicherkrankheit vom Typ II ist ein autosomal rezessives Erbleiden, welches erstmalig 1932 von Pompe beschrieben wurde (1). Sie ist gekennzeichnet durch eine Glykogenanreicherung in den Lysosomen und das Fehlen der sauren α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) (2, 3). Es gibt drei Varianten dieser Krankheit. Je nachdem wann sie ad exitum führt, unterscheidet man eine adulte, juvenile und infantile Variante. Bei der infantilen Form sind die deutlichsten klinischen Symptome Kardiomegalie und ausgeprägte Muskelschwäche. Meistens sterben diese Patienten im ersten Lebensjahr an einer kardio-respiratorischen Insuffizienz. Bei der adulten Form fehlen die kardialen Symptome und die Patienten zeigen nur eine zunehmende Muskelschwäche (4,5). Die juvenile Variante wird meist als "Zwischenform" bezeichnet (6).

Mehrere Autoren berichteten vor kurzem (7-10), daß diese unterschiedlichen Manifestationsformen des Morbus Pompe vielleicht auf noch vorhandene saure α -Glucosidase zurückzuführen sind. Untersuchte Gewebeproben und Fibroblasten von Patienten mit der adulten Variante enthielten noch 10 - 30% der sauren α -Glucosidase von Kontrollen, während Proben von Patienten mit der infantilen Variante weniger als 0,5% enthielten. Eine endgültig zufriedenstellende Erklärung für diese unterschiedlichen Formvarianten gibt es jedoch noch nicht.

Die lysosomale saure α -Glucosidase wurde bisher schon aus Rinder- und Rattenleber (11, 12), Hasenmuskel (13), Human-Plazenta (14) und Humanleber (15, 16) isoliert. Beim Menschen konnte die saure α -Glucosidase bisher in den meisten Gewebearten enzymatisch nachgewiesen werden, einschliesslich in den Lymphozyten und den Amnionzellen (17, 18). Der zuletzt erwähnte Umstand ermöglicht auch die pränatale Diagnose von Morbus Pompe bei Risiko-

schwangerschaften (19). Hierbei kann jedoch bisher nicht immer ausreichend zwischen den einzelnen Pompe-Varianten und der Heterozygoten-Pompe-Form differenziert werden (20).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst genaue Kenntnisse über die Eigenschaften und Zusammensetzung isolierter saurer α -Glucosidase aus Humanleber zu erhalten. Insbesondere sollte eine eventuell vorhandene Untereinheiten-Struktur des Enzyms aufgeklärt werden. Mit Hilfe von Antikörpern gegen das isolierte Enzym sollte untersucht werden, ob in Fibroblasten von Patienten mit Morbus Pompe irgendwelche Untereinheiten oder Vorstufen-Polypeptide der sauren α -Glucosidase hergestellt werden bzw. ob überhaupt eine Translation von antigen-wirkenden Polypeptiden stattfindet. Gegebenenfalls sollte das veränderte Enzym bzw. die defekten Untereinheiten-Strukturen näher identifiziert werden. In diesem Zusammenhang war auch daran gedacht eine neue Methode zur exakten Pompe-Typen-Bestimmung zu entwickeln.

2. Ergebnisse

2.1. Isolierung der sauren lysosomalen α -Glucosidase aus Humanleber.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahren zur Isolierung der lysosomalen α -Glucosidase aus Humanleber lehnen sich an die bekannten Verfahren der Literatur an (14-16). Sie setzen sich in der Hauptsache aus zwei Teilschritten zusammen:

1. die Herstellung eines Leberextrakts mit angereicherter α -Glucosidase Aktivität, und
2. die Gelfiltration auf einem Affinitätsharz.

2.1.1. Herstellung eines Leberextrakts

Humanleber wurde 6 - 12 Std. post mortem während Autopsie entfernt. (Dies wurde durch das freundliche Entgegenkommen des Gerichts-Medizinischen Instituts der Universität München ermöglicht). Das Alter der Verstorbenen reichte von 1/2 Jahr bis 57 Jahren. Es konnten bei Voruntersuchungen keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der spezifischen Aktivität der sauren α -Glucosidase festgestellt werden (Durchschnittswert: 5,7 U/g Protein, Streubereich von 4,3 - 7,1 U/g Protein), weder nach Geschlecht, Alter, oder Todesursache. Die entnommene Leber wurde kurz in kaltem Wasser bei 0° C gewaschen und anschliessend sofort bei -50° C bis zum Gebrauch gelagert.

Zur Herstellung eines Leberhomogenats wurden die Leber von 16 Verstorbenen im gefrorenen Zustand in kleine Stücke geschnitten, wobei Bindegewebsstränge weitgehend entfernt wurden. Die noch gefrorenen Leberstücke wurden mit Puffer A (25 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 5) im Verhältnis 1:2 (w/w) in einem Braun-Mixer homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit Cholsäure (Endkonz. 0,5%) versetzt, mit einem Ultra-Turrax (Sorvall) nochmals homo-

genisiert und etwa 10 min. mit Ultraschall behandelt (Branson-Sonifier, Stufe 7). Dabei wurde darauf geachtet, daß die Temperatur nicht über 4° C steigt. Das Homogenat wurde dann zentrifugiert (Sorvall GS-3 Rotor, 4500 rpm, 20 min). Hierbei zeigte sich, daß die Sedimentations-eigenschaften der unlöslichen Leberbestandteile insbesondere durch die Anwesenheit der Cholsäure verbessert wurden, und damit die Ausbeute bei diesem Schritt erhöht werden konnte. Das Sediment wurde mit Puffer A (2:1; V/V) nochmals homogenisiert und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände enthielten etwa 85% der sauren α -Glucosidase des ursprünglichen Homogenats.

Der Überstand wurde mit Essigsäure (konz.) vorsichtig unter ständigem Rühren auf pH 4 eingestellt, etwa 1 Stunde bei 0° C stehengelassen und anschließend auf pH 5,5 mit NH_4OH (5M) titriert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand durch langsame Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf 25% Sättigung (bei 4° C) gebracht. Nach 2 Std. wurde zentrifugiert und der resultierende Überstand durch Zugabe von weiterem Ammoniumsulfat auf 55% Sättigung gebracht. Unter ständigem leichten Rühren wurde die Lösung über Nacht stehengelassen. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren (s.o.) pelletiert und in wenig Puffer A mit 0,5% Na-Cholat, pH 5 (Puffer B) wieder aufgelöst. In diesem Zustand konnte die lysosomale α -Glucosidase ohne wesentlichen Verlust (< 2%/a) bei -40° C gelagert werden.

Zur weiteren Anreicherung der sauren α -Glucosidase wurde das aufgelöste Präzipitat zunächst gegen Puffer B (1:10) zweimal dialysiert. Die Ausschlussgrenze des verwendeten Dialyseschlauches lag bei einem MG von etwa 30 000 (Union Carbide). Nach Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile wurde nochmals mit Ammoniumsulfat eine Proteinfällung vorgenommen (s.o.). Das zwischen 25 - 45 % Sättigung ausfallende Protein wurde durch Zentrifugation pelletiert und in wenig Puffer A aufgenommen. Anschließend wurde nochmals zweimal gegen Puffer A (1:20) dialysiert (s.o.; vgl. Tabelle I).

2.1.2. Reinigung der lysosomalen α -Glucosidase mittels Gelfiltration

Zur weiteren Reinigung der lysosomalen α -Glucosidase wurde der hergestellte Leberextrakt mit Puffer A zunächst verdünnt, bis eine Proteinkonzentration von etwa 50 mg/ml resultierte. Der pH der Lösung wurde nochmals kontrolliert und, falls erforderlich, auf pH 5 eingestellt. Die Chromatographie auf Sephadex G-100 erfolgte erst nach sorgfältigem Waschen des Harzes mit Harnstoff (6 M) und anschließender Äquilibrierung mit Puffer A. Die verwendete Säule (7,5 x 150 cm) enthielt 5,7 l gequollenes Sephadex G-100. Es wurden etwa 4 g Protein (Leberextrakt) pro 1 Sephadex G-100 aufgetragen. Der Durchfluß betrug 70 ml Puffer A/std. 10 ml Fraktionen wurden gesammelt. Die Chromatographie fand bei 2°C statt.

Der Hauptteil der aufgetragenen Proteinmenge wurde mit den ersten 7 l eluiert (Abb. 1). Die lysosomale α -Glucosidase konnte in geringen Mengen in sämtlichen Fraktionen mit nachweisbarem Proteingehalt gemessen werden. Auch nachdem der Proteingehalt der Fraktionen ohne Einengung nicht mehr nachweisbar war, konnte die α -Glucosidase noch enzymatisch gemessen werden. Während der nächsten 7 l Elutionsflüssigkeit wurde konstant ein geringer Pegel an Enzym eluiert. Dann wurde durch Zugabe von 2% Maltose zum Elutionspuffer nach einem Latenzvolumen von etwa 5 l der Hauptteil der lysosomalen α -Glucosidase von der Säule eluiert. Die in Abb. 1 als F₀ bezeichnete Fraktion enthielt ca. 70% der aufgetragenen Menge an α -Glucosidase. Die Fraktion wurde mittels Ultrafiltration in einer Amicon Ultrafiltrationszelle mit einer Diaflo PM-30 Membran eingeengt. Wie in Tabelle I zu sehen ist, war das Enzym ca. 2070-fach durch den Sephadex G-100-Schritt angereichert worden und besaß eine spezifische Aktivität von etwa 11 800 Units/g Protein.

Zur weiteren Reinigung der α -Glucosidase bewährte sich die Rechromatographie auf Sephacryl S-200. Auch dieses

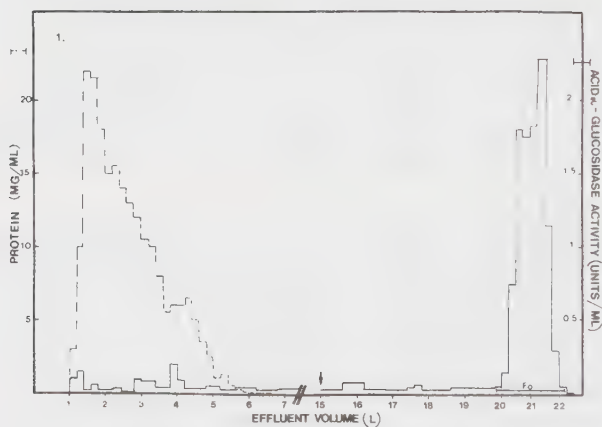


Abb. 1

Gelfiltration des hergestellten Leberextrakts auf einer Sephadex G-100 Säule (7,5 x 150 cm) (vgl. Text).

-----: Proteingehalt der Fraktion;

————: Saure α -Glucosidase-Aktivität der Fraktion.

Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe von Maltose zur Elutionsflüssigkeit an.

Harz wurde vor Gebrauch ausgiebig mit Harnstoff (6 M) gewaschen und anschliessend mit Puffer A + 5% Maltose äquibriert. Mit diesem Verfahren wurde erreicht, daß die saure α -Glucosidase nicht auf dem Harz festgehalten wurde (vgl. unter 2.1.3.) und unter Bedingungen chromatographiert wurde, die für das Enzym optimal schonend waren (vgl. Kap. 2.2.1.). Die verwendete Säule (2,5 x 100 cm) enthielt 440 ml Sephacryl S-200. Aufgetragen wurden 195 mg Protein der Fraktion F_0 , die in 10 ml Puffer A - 5% Maltose gelöst waren. Der Durchfluß betrug 10 ml Puffer/std., gesammelt wurden 2 ml Fraktionen. Alle Schritte fanden bei 20° C statt.

In Abb. 2 erkennt man, daß die Proteinelution weitgehend der Enzymelution entspricht. Lediglich zu Beginn der Proteinelution ist etwas enzymatisch-inaktives Protein vorhanden. Die in Abb. 2 als F_1 bezeichnete Fraktion enthielt 93% der aufgetragenen sauren α -Glucosidase. Die spezifische Aktivität dieser Fraktion betrug 13 200 Units/g Protein, was eine Anreicherung von 2310 entspricht. (vgl. Tabelle I). Anhand des Elutionsverhaltens von Vergleichsproteinen konnte für die α -Glucosidase ein Molekulargewicht von etwa 80 - 95 000 ermittelt werden. (vgl. Methoden)

Eine höhere Anreicherung des Enzyms konnte bislang nicht erzielt werden. Insbesondere konnte durch Affinitäts-Chromatographie auf einem selbst hergestellten Sepharose 6-B Gel an das Turanose gekoppelt war, das als potenter Inhibitor der sauren α -Glucosidase gilt (21), keine bessere Anreicherung erzielt werden als mit der oben geschilderten Methode. Auch die von Koster et al. (16) angewandte Ionenaustausch-Chromatographie auf DEAE-Cellulose brachte keine bessere Anreicherung. (vgl. Kap. 2.2.2.)

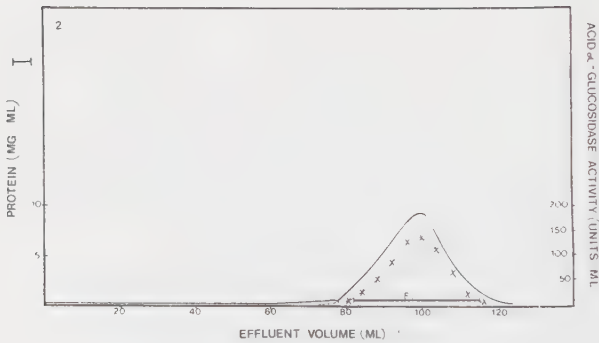


Abb. 2

Gelfiltration der angereicherten Enzymfraktion F (Abb.1) auf einer Sephacryl S-200 Säule (2,5 x 100 cm) in Gegenwart von 5% Maltose (vgl. Text).

————: Proteingehalt der Fraktion;

-----: Saure α -Glucosidase-Aktivität der Fraktion.

Tabelle I

Isolierung der lysosomalen sauren α -Glucosidase
aus Humanleber

Fraktion	Aktivität (U/g Protein)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Homogenat-Überstand nach Cholatextraktion	5,7	100	1
Überstand nach Säure-Denaturierung	12,0	87	2,1
1. Ammoniumsulfat- Präzipitation (25-55%)			
a) undialysiert	62,8	61	11,0
b) dialysiert	104,1	54	18,3
2. Ammoniumsulfat- Präzipitation (25-45%) dialysiert	146,0	47	25,6
Sephadex G-100	11800	33	2070
Sephacryl S-200	13200	31	2310

2.1.3. Isolierung von kleinen Mengen saurer α -Glucosidase.

Bei der Aufarbeitung kleiner Mengen Humanleber zeigte sich, daß nicht unbedingt alle angegebenen Schritte notwendig sind um saure α -Glucosidase von hoher Reinheit zu gewinnen. So konnte bei der Aufarbeitung von ca. 50 g Rohleber (entspricht etwa 60 000 mU saure α -Glucosidase) sowohl der Säuredenaturierungsschritt, wie auch die sich anschließenden Fällungen mit Ammoniumsulfat weggelassen werden. Die Leber wurde hierbei zunächst nach der erwähnten Methode homogenisiert und zentrifugiert. Die gesammelten Überstände wurden anschließend nochmals bei 30 000 x g für 30 min. zentrifugiert. Dabei bildeten sich neben wenig Sediment zwei Phasen. Die obere fett-haltige Phase wurde abgetrennt (etwa 20-30% des Volumens) und verworfen. Die untere fettarme Phase wurde gesammelt und zweimal gegen Puffer B, sowie zweimal gegen Puffer A dialysiert (jeweils 10:1 v/v; die Ausschlußgrenze des Dialyseschlauches lag bei einem MG von 30 000). Anschließend wurde nochmals zentrifugiert um unlösliche Niederschläge zu pelletieren (20 000 x g, 10 min). Der Überstand zeigte nur eine geringe Anreicherung der α -Glucosidase (ca. 8,6 mU/mg Protein). Was sich jedoch als wichtig für die folgende Chromatographie auf Sephacryl S-200 erwies, war, daß fast alles Fett entfernt worden war. Der Verlust an saurer α -Glucosidase betrug vor der Chromatographie etwa 30%.

Der entstandene Leberextrakt wurde durch Ultrafiltration (s.o.) auf 50 ml eingeeengt und auf pH 5 eingestellt. Diese Lösung wurde alsbald auf eine mit Sephacryl S-200 gefüllte Säule (2,5 x 100 cm; Füllvolumen 450 ml Gel) aufgetragen. Das Sephacryl S-200 Gel wurde zuvor wie oben beschrieben mit Harnstoff gewaschen, anschließend jedoch nur mit Puffer A (ohne Maltose!) äquilibriert. Die Säule wurde zunächst mit Puffer A entwickelt (Durchfluß: 10 ml/Std; Fraktionen: 5 ml) bis ohne Einengung der Fraktionen kein Protein nachgewiesen werden konnte. Durch Zugabe von 5%

Maltose zum Elutionspuffer wurde anschließend 45% der aufgetragenen Menge an saurer α -Glucosidase als kleine Fraktion eluiert (vgl. Abb. 1). Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug 9800 U/g Protein. Durch Rechromatographie dieser Präparation auf Sephacryl S-200 in Gegenwart von Maltose (vgl. oben) konnte eine Fraktion isoliert werden, die ca. 70% der aufgetragenen Enzymmenge enthielt und eine spezifische Aktivität von ca. 13 000 U/g Protein hatte. Diese verkürzte Methode scheint demnach geeignet aus kleinen Lebermengen saure α -Glucosidase von hoher Reinheit mit guter Ausbeute (22%) zu isolieren.

2.2. Charakterisierung der isolierten sauren lysosomalen α -Glucosidase aus Humanleber

2.2.1. Stabilität der α -Glucosidase

Die Stabilität der sauren α -Glucosidase wurde anhand der Fähigkeit 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosid (MUF-Glu) zu spalten untersucht. Es handelt sich um ein teilweise sehr empfindliches Enzym. So geht z. B. durch Lyophilisieren des Enzyms bis zu 63% der Aktivität verloren. Wird das Enzym in niedriger Konzentration ($< 1 \mu\text{g/ml}$) und bei niedrigem Salzgehalt ($< 10 \text{ mM}$) aufbewahrt, verliert es selbst bei -40°C monatlich noch 4-6% an Aktivität. Bei höheren Enzymkonzentrationen ($> 1 \text{ mg/ml}$) wie auch bei höheren Salzkonzentrationen ($> 100 \text{ mM}$) verliert es hingegen auch bei 0°C monatlich nur geringfügig an Aktivität (1%).

Die Gegenwart von Albumin ($> 250 \mu\text{g/ml}$) bewirkt eine etwa 25%ige Aktivitätszunahme des Enzyms. Albumin kann nicht nur einen Aktivitätsabfall des Enzyms verhindern, sondern manchmal auch einen eingetretenen Abfall an Aktivität wieder aufheben, so z.B. wenn isolierte α -Glucosidase längere Zeit ($> \text{ein Monat}$) trotz hoher Salz- und Enzymkonzentration bei 5°C gelagert wurde und deshalb ein Aktivitätsverlust eingetreten ist.

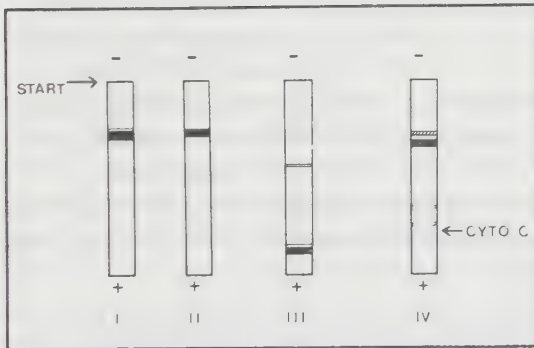
Das Enzym ließ sich am besten bei pH 5 aufbewahren. Ein pH unter 3 und über 7 verursacht schon nach einigen Stunden einen Aktivitätsverlust. Albumin kann diesen Verlust verringern oder je nach pH sogar verhindern. Temperaturen von über 40° C können nur kurzfristig, auch in Gegenwart von Albumin, ohne einen Enzymaktivitätsverlust vertragen werden. Kühlraumtemperaturen (ca. 5° C) können längerfristig nur in Gegenwart von Albumin ohne Aktivitätsverlust überstanden werden (vgl. oben).

Zur Aufbewahrung von isolierter saurer α -Glucosidase haben sich folgende Maßnahmen bewährt:

- a) Hohe Enzymkonzentrationen (ca. 5 mg/ml)
- b) Salzkonzentrationen von 0,15 - 0,2 M
- c) Temperatur bei -40 bis -70° C
- d) gefüllte Vorratsgefäße (wegen Gefrier Trocknungseffekt)
- e) kein häufiges Auftauen

2.2.2. Elektrophoretische Eigenschaften

Abb. 3 zeigt einen Überblick der unterschiedlichen elektrophoretischen Eigenschaften der isolierten α -Glucosidase bei verschiedenen Laufbedingungen. In I ist das Schema einer Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (22) der Sephacryl S-200 Fraktion F₁ zu sehen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Neben einer Hauptbande kann eine kleine Nebenbande gesehen werden. Beide Banden ließen sich auch sichtbar machen, wenn vor der Proteinfärbung das Gel mit MUF-Glu-haltigem Puffer bei 37° C etwa 10 - 20 min bei pH 4 inkubiert und anschließend in Na-carbonat-Puffer (1,0 M, pH 10,7) gelegt und mit einer Lichtquelle bei 365 nm betrachtet wurde. Ferner konnten die Banden mit der PAS-Färbemethode als Glykoproteine identifiziert werden (22). Die relative Färbeintensität der Banden änderte sich bei Anwendung der verschiedenen Färbemethoden nicht merklich. Konstant betrug der Anteil der kleinen Bande etwa 6-8%.



ELECTROPHORETIC MIGRATION OF ACID α -GLUCOSIDASE IN POLYACRYLAMIDE GELS

Abb. 3

Auftrennung der isolierten sauren α -Glucosidase im elektrischen Feld auf Polyacrylamid-Gelen (vgl. Text)

I und II: Elektrophoretische Analyse nach Bloemendal (22);

III: Isoelektrische Fokussierung nach Winter et al. (23)

IV: SDS-Gelelektrophoretische Analyse nach Segrest et al. (24)

Durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose konnte, wie in Abb. 3 II sichtbar, das mengenmässige kleinere Isoenzym abgetrennt werden. Dazu wurde eine Säule (0,7 x 60 cm) mit 20 ml DEAE-Cellulose (gequollenes und gewaschenes Harz, in NaCl-Puffer 10 mM, pH 5) gefüllt und, nach Auftragen von 1 mg isoliertem Enzym (in 10 mM NaCl, pH 5), mit einem linearen Gradienten (10 mM - 100 mM NaCl; insgesamt 100 ml) entwickelt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 5ml/Std. bei 4° C. Das Elutionsprofil wies nur einen Peak nach ca. 35 ml auf. Die spezifische α -Glucosidase-Aktivität dieser Fraktion war 13 150 mU/mg Protein. 62% der aufgetragenen Enzymmenge konnte nicht mehr von der Säule eluiert werden, auch nach Erhöhung der Salzkonzentration, Veränderungen des pH und Zugabe von Maltose in den Elutionspuffer. Bisher schlugen sämtliche Versuche fehl, das geringer vorhandene α -Glucosidase Isoenzym in reiner Form darzustellen.

In Abb. 3 III wird das Schema einer isoelektrischen Fokussierung der isolierten Sephacryl S-200 Fraktion auf einem Polyacrylamid-Gel gezeigt. Das Gel enthielt pH 3 - 8 Ampholine (23). Die Proteinbanden wurden nach Fixierung mit Sulfosalicylsäure und TCA mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die vier gezeigten Banden haben ihren isoelektrischen Punkt ca. bei pH 4,65 (Bande 1), pH 4,95 (Bande 2), pH 6,41 (Bande 3) und pH 6,43 (Bande 4) (von unten nach oben). Mit MUF-Glu ließen sich nur die Banden 1 und 2 darstellen (s.o.). Die Bande 2 war bei der isoelektrischen Fokussierung der DEAE-Cellulose gereinigten Enzympräparation nicht vorhanden (s.o.). Das Auftreten der Banden 3 und 4 war von der Vorbehandlung des Enzyms abhängig. Sie verschwanden vollständig, wenn frisch gereinigte saure α -Glucosidase elektro-fokussiert wurde. Schon nach einer Lagerzeit von 2 Tagen bei 5° C traten die Banden 3 und 4 schwach auf. Durch hohe Enzym- und Salzkonzentrationen (vgl. unter 2.2.1.) der gelagerten Enzymlösung konnte ein verstärktes Auftreten dieser Banden weitgehend verhindert werden. Die längere

Lagerung des Enzyms bei 5° C (4 Wochen) oder schon die kurze Lagerung (etwa 3 Tage) bei Zimmertemperatur verursachte eine Vermehrung enzymatisch inaktiver Banden. Ebenso erzeugte die halbstündige Inkubation des Enzyms bei alkalischem pH (pH 8) ein Zunehmen dieser Banden. Durch längere Inkubation bei alkalischem pH konnten Coomassie-Blau-angefärbte Banden nach Elektro-Fokussierung im pH Bereich von 5,3 - 5,8 (auf der Zeichnung zwischen Bande 2 und Bande 3) zerstreut beobachtet werden. Diese neu-auf tretenden Banden konnten nicht mit MUF-Glu sichtbar gemacht werden.

Eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Banden 3 und 4 sowie der ebengenannten enzymatisch aktiven Banden mit einer Abnahme der Enzymaktivität ist vorhanden, vorausgesetzt die Enzymaktivität wurde nicht in Gegenwart von Albumin gemessen. Bei Anwesenheit von Albumin konnte der Aktivitätsverlust oft wieder aufgehoben werden (vgl. unter 2.2.1.), obwohl die Elektrofokussierungs-Untersuchungen in Gegenwart von Albumin kein Hinweis für einen Rückgang der enzymatisch inaktiven Banden gaben. Untersuchungsbedingungen bei denen die Banden 1 und 2 zugunsten der Banden 3 und 4 völlig verschwanden, konnten nicht gefunden werden. Im günstigsten Falle (nach zweimonatlicher Lagerung des Enzyms bei 5° C) waren 28% der anfärbbaren Enzymproteine nach Elektrofokussierung in den Banden 3 und 4 nachweisbar. Der Enzymaktivitätsverlust betrug dabei in Gegenwart von Albumin gemessen ca. 5%, in Abwesenheit von Albumin ca. 13%.

Die SDS-Gel-elektrophoretische Analyse (24) der isolierten Sephacryl S-200 Fraktion ist in Abb. 3 IV zu sehen. Die Proteine wurden wieder mit Coomassie Blau angefärbt. Vier Proteinbanden sind in dem Schema sichtbar. Anhand der elektrophoretischen Beweglichkeit dieser Banden können diese Proteinkomplexen mit scheinbaren Molekulargewichten von ca. 148 000, 102 000, 22 000 und 13 000 zugeordnet werden (von oben nach unten). Ein Densitogramm der gezeigten SDS-Gelelektrophorese ist in Abb. 8a zu sehen.

Das relative Verhältnis der Banden zueinander, gemessen an der Proteinfärbung, war stark von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig. So konnte eine relative Zunahme der Bestandteile mit niedrigem Molekulargewicht unter ähnlichen Bedingungen beobachtet werden, wie bei der isoelektrischen Fokussierung eine Zunahme der Banden 3 und 4 (s.o.) Gewöhnlich betrug der Anteil der niedergewichtigen Bestandteile ca. 3 - 6%, auch bei frischen Enzympräparationen. Dieser Anteil konnte bis auf ca. 24% ansteigen, wenn das Enzym zuvor zwei Monate bei niedriger Salzkonzentration und 5° C aufbewahrt wurde (vgl. Elektrofokussierung) oder wenn das Enzym nach Zugabe von SDS-haltigem Puffer (10 mM Tris, 1% SDS, pH 8) über Nacht bei Zimmertemperatur gehalten wurde. Durch längeres Inkubieren der SDS-haltigen Enzymlösung bei Zimmertemperatur traten bei der SDS-gelelektrophoretischen Analyse neue Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich zwischen 25 000 bis 90 000 und über 150 000 auf.

Das relative Verhältnis der Banden mit hohem bzw. niedrigem Molekulargewicht zueinander variierte stark, je nachdem welche Gele verwendet wurden. So konnte z. B. beobachtet werden, daß bei Polyacrylamid-Gelen mit hohem Vernetzungsgrad (15%) die Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 148 000 meist relativ kleiner war als die Bande mit einem Molekulargewicht von 102 000, wohingegen dies meist umgekehrt war bei Gelen mit geringem Vernetzungsgrad (7,5%) (vgl. später Abb. 6 a mit Abb. 8 a). Keine Banden konnten auf der SDS-Elektrophorese mit MUF-Glu sichtbar gemacht werden, dies bedeutet, daß die Proteinstruktur des Enzyms weitgehend verändert worden war. Mit der PAS-Färbung ließen sich nur die zwei Banden im hohen Molekulargewichtsbereich eindeutig als Glykoproteine identifizieren. Die SDS-gelelektrophoretische Analyse der über DEAE-Cellulose gereinigten Enzympräparation ergab keinen Unterschied zur Sephacryl S-200 Fraktion. Zusammenfassend kann an dieser Stelle folgendes festgehalten werden:

Die isolierte saure α -Glucosidase aus der Leber von 16 Menschen ist ein Enzym, welches in mindestens zwei Formen vorkommt. Die zwei Isoenzyme können auf einer normalen Polyacrylamid-Elektrophorese in zwei enzymatisch aktive Banden aufgespalten werden. Der Anteil des mehr kathodischen Isoenzyms beträgt 6 - 8%. Bei der isoelektrischen Fokussierung der Isoenzyme sind neben zwei enzymatisch aktiven Proteinbanden je nach Alter und vorheriger Lagerbedingungen der Enzympräparation zusätzlich zwei inaktive Banden zu sehen. Diese können bis zu 26% des aufgetrennten Proteins ausmachen. Die normale Enzym-Gelelektrophorese zeigt unter ähnlichen Bedingungen keine zusätzlichen Banden. Bei der SDS-Gelelektrophorese wird das Enzym in vier enzymatisch inaktive Proteinbanden aufgespalten. Sie besitzen scheinbare Molekulargewichte von 148 000, 102 000, 22 000 und 13 000. Der Anteil der beiden Banden mit niedrigem Molekulargewicht ist auch von dem Alter und den Lagerbedingungen der Enzympräparation abhängig. Er beträgt bei frischen Präparationen 3 - 6% bei älteren bis zu 24%.

Dieses Ergebnis könnte z. B. bedeuten, daß die saure α -Glucosidase limitiert eigene Enzymmoleküle abbaut. Aufgrund des gleichen Molekulargewichts und des gleichen isoelektrischen Punktes der "Spaltstücke" kann angenommen werden, daß diese vermutlich einheitlich sind.

Da das elektrophoretisch analysierte Mengenverhältnis der "Spaltstücke" zueinander von Faktoren wie z. B. der Selbvernetzung abhängig war, erscheint es möglich, daß nur ein "Spaltstück" existiert, dieses jedoch je nach Elektrophorese-Bedingung mehr oder weniger Dimere bilden kann.

Die Tatsache, daß bei der SDS-gelelektrophoretischen Analyse des Enzyms eine Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 148 000 vorhanden ist, erscheint zunächst schwer verständlich. Die Molekulargewichtsbestimmung des Enzyms auf Sepharosyl E-200 ergab etwa 80 - 95 000. Bedenkt man, daß Glycoproteine auf der SDS-Gelelektrophorese oft erhöhte

Molekulargewichtswerte anzeigen (21), so entspräche die Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 102 000 dem nativen Enzym. Die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 148 000 könnte ein Aggregat darstellen, welches aus Enzym plus "Spaltstücke" besteht. Diese Annahme könnte jedoch nicht erklären, weshalb z.B. dann in 15%igen Gelen bei einer Abnahme der "148 000-Komponente" keine entsprechende Zunahme der kleinen "Spaltstücke" beobachtet wird, sondern nur eine Vermehrung der "102 000-Komponente" (vgl. Abb. 8 a mit Abb. 6 a später). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß Enzymuntereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 50 000 existieren, die unter den Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese Dimere oder Trimere bilden.

2.2.3. Sonstige Eigenschaften

Die Fähigkeit der sauren α -Glucosidase MUF-Glu zu spalten ist vom pH der Reaktionslösung abhängig. Diese Abhängigkeit ist in Abb. 4 dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, daß im Bereich zwischen pH 4,2 - 4,6 das Optimum der Enzymaktivität liegt. Alle Messungen wurden aus den unter 2.2.1. erwähnten Gründen in Gegenwart von Albumin (0,5 mg/ml) vorgenommen.

Die graphische Berechnung der K_m nach Lineweaver und Burk ergab für MUF-Glu 1,1 mM und für Maltose 9,0 mM. Keine Substrathemmung konnte sowohl bei MUF-Glu (bis 10 mM) wie auch bei Maltose (bis 40 mM) festgestellt werden.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren wurde nach der Dansylierungsmethode von Hartley (25) vorgenommen. Hierbei zeigte sich, daß 85 - 90% der Enzymproteine Glutaminsäure als N-terminale Aminosäure besitzen. Alanin, Glycin und Valin sind zu gleichen Teilen N-terminale Aminosäure bei ca. 10 - 15% der Enzymproteine. Zwischen der Sephacryl S-200 Fraktion und der DEAE-Cellulose Fraktion (s.o. Kap. 2.2.2.) bestand kein wesentlicher Unterschied.

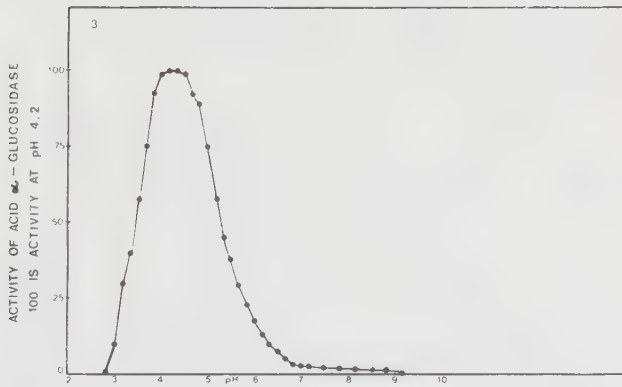


Abb. 4

Aktivität der isolierten sauren α -Glucosidase in Abhängigkeit vom pH. (Spaltung von MUF-Glu).

Lys	16	In der Tabelle II ist das Ergebnis einer vorläufigen
His	23	Aminosäureanalyse der über DEAE-Cellulose gereinigten
Arg	49	sauren α -Glucosidase wiedergegeben. Das Protein wurde
Asp	103	48 Std. in 6 n HCl bei 110° C hydrolysiert. Bei der
Thr	72	Angabe der Aminosäuren wurde davon ausgegangen, daß
Ser	71	die α -Glucosidase vermutlich ein Molekulargewicht
Glu	126	von etwa 100 000 besitzt (vgl. 2.2.2.). Aus technischen
Pro	88	Gründen konnte diese Aminosäureanalyse bisher erst
Gly	81	einmal gemacht werden. Deshalb fehlt noch jegliche
Ala	71	Vergleichsmöglichkeit z. B. zur Sephacryl S-200
Cys	8	Enzymfraktion oder zu den Analysewerten nach 24
Val	64	und 72 Std. Hydrolysedauer.
Met	23	
Ile	32	Zur Untersuchung der Frage, ob sich die isolierte
Leu	105	α -Glucosidase durch die Spaltung von Disulfid-
Tyr	33	brücken in Untereinheiten zerlegen läßt, wurde die
Phe	47	Sephacryl S-200 Fraktion mit unterschiedlichen
		Reagenzien behandelt und anschließend einer SDS-
		gelelektrophoretischen Analyse unterzogen. Sowohl

Tabelle II: Aminosäureanalyse der sauren lysosomalen α -Glucosidase aus Humanleber, DEAE-Cellulose Fraktion (siehe Text).

unterschiedliche Konzentrationen an 2-Mercaptoäthanol wie auch Dithiothreitol veränderten das elektrophoretische Bandenmuster (vgl. Abb. 3 IV) nicht wesentlich. Auch die sehr aufwendige Behandlung von α -Glucosidase mit Performiat (26) führte zu keinem Erfolg. Die SDS-gelelektrophoretische Analyse der anfallenden Produkte zeigte in diesem Fall neben dem gewohnten Bandenmuster von Abb. 3 IV ein Wirrwarr unterschiedlicher Proteinbanden, die wahrscheinlich eine Folge der stark oxydierenden Wirkung des Performiat sind. Auch die S-Carboxymethylierung der α -Glucosidase in Gegenwart von Guanidin, mit Harnstoffdialyse und SDS-Behandlung (27) konnte keine Aufspaltung des Enzyms in Untereinheiten bewirken. Manchmal konnte bei der SDS-gelelektrophorese eine geringe

Zunahme der Proteinbanden im niedrigen Molekulargewichtsbereich festgestellt werden. Dies beruhte jedoch vermutlich nicht, wie unter 2.2.2. aufgeführt, auf einer Disulfidbrückenspaltung.

- 2.3. Studien über die saure lysosomale α -Glucosidase von Fibroblasten mit Hilfe von Antikörpern gegen die isolierte saure lysosomale α -Glucosidase aus Humanleber.

2.3.1. Antikörper gegen α -Glucosidase: Herstellungsvarianten.

Antikörper gegen die saure α -Glucosidase aus Menschenleber wurden in Hasen hergestellt(36). Es wurden Antikörper sowohl gegen das intakte Enzym, wie auch gegen ein mit SDS vorbehandeltes Enzympräparat hergestellt. Hierbei wurde spekuliert, daß Antikörper gegen das SDS vorbehandelte Enzym eventuell gegen zuzügliche antigene Determinanten gerichtet sein könnten. Abb. 5 zeigt, daß beide Antikörper-Präparationen im Ouchterlony Test (35) sowohl mit der als Antigen verwendeten Enzymfraktion (Sephacryl S-200 Fraktion) wie auch mit Leberhomogenat nur eine Präzipitationslinie ergeben. Die unterste Enzymnachweisgrenze betrug im Ouchterlony Test ca. 0,05 - 0,1 μ g α -Glucosidase. Wurde das Enzym zuvor längere Zeit bei 5° C in einer Lösung mit geringem Salzgehalt aufbewahrt oder kurze Zeit bei alkalischem pH inkubiert (vgl. Kap. 2.2.1.), so trat häufig eine zweite mehr peripher gelegene Präzipitationslinie bei beiden Antikörper-Präparationen auf.

2.3.2. Verwendung von Antikörper gegen α -Glucosidase zur Untersuchung von in vivo radioaktiv markierter α -Glucosidase aus menschlichen Fibroblasten.

Anhand der veränderten K_m von saurer α -Glucosidase aus Fibroblasten (2,9 mM für MUF-Glu und 16,7 mM für Maltose) gegenüber dem Leberenzym (vgl. 2.2.3.) wurde angenommen, daß es sich hierbei wahrscheinlich um ein Isoenzym handelt. Im Ouchterlony Test konnte gezeigt werden, daß

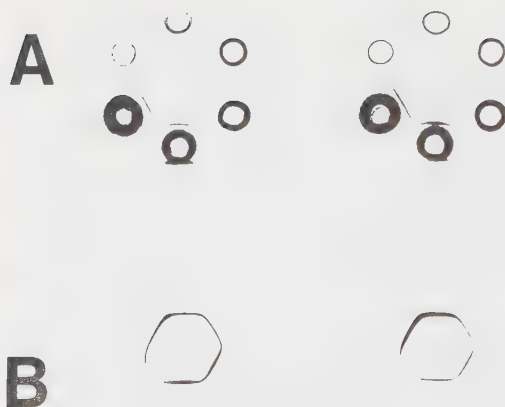


Abb. 5

Ouchterlony Diffusions-Test (35).

Zentrales Loch:

A1/B1: Antiserum gegen SDS-desintegrierte saure α -Glucosidase

A2/B2: Antiserum gegen intakte saure α -Glucosidase.

Peripherie:

A1/A2: Humanleber-Homogenat;

unten links: Lochfüllung entspricht ca. 0,4 μ g saure
 α -Glucosidase;

B1/B2: gereinigte saure α -Glucosidase;

unten links: Lochfüllung entspricht ca. 3,2 μ g Enzym;

kontinuierliche Abnahme gegen Uhrzeigersinn jeweils um Faktor 2.

dieses Enzym auch eine Präzipitationslinie mit Antikörper gegen das Leberenzym bildet.

Bei der Antikörper-Fällung von saurer α -Glucosidase aus Fibroblasten stellte sich das Problem, daß sehr wenig Enzym gefällt werden sollte und auch nach Zentrifugation kein sichtbares Präzipitations-Pellet entstand, außer bei dem Einsatz großer Mengen von Fibroblasten, was jedoch aus technischen Gründen nicht immer möglich war. Mehrere Ersatz-Möglichkeiten boten sich hier an: 1. die Fällung von α -Glucosidase aus Fibroblasten in Gegenwart von α -Glucosidase aus Leber (Co-Präzipitation); 2. die Präzipitation eines Überschusses an Hasen IgG nach der Reaktion mit α -Glucosidase mit einem Antikörper gegen Hasen IgG (Doppel-Präzipitation); 3. die Anwendung von an Sepharose gekoppelten Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Pharmacia), das spezifisch mit dem F_c -Anteil des Antikörpers reagiert und die Antigenbindungsstruktur F_{ab} nicht beeinflusst (28).

Die zuletzt genannte Methode hatte mehrere Vorteile.

Zunächst konnte mit radioaktiv markierten IgG aus Hasen (Geschenk von S. Werner, 29) gezeigt werden, daß im Vergleich zur Doppel-Präzipitationsmethode quantitativ mehr Hasen IgG aus einer Versuchslösung (10 mM Tris, 0,3 M NaCl, pH 7,4) entfernt werden konnte (Doppel-Präzipitationsmethode: max. 78% der Radioaktivität, Protein A-Sepharose Cl 4 Methode 96 - 98%). Im Vergleich zur Co-Präzipitationsmethode zeigte die Protein A-Gel Methode besser reproduzierbare Ergebnisse. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß bei dem Waschen des Präzipitates bei der Co-Präzipitationsmethode der Überschuss an zugegebenen Antikörpern verloren geht und dadurch ein Abdissoziieren des schwächer gebundenen Isoenzym aus Fibroblasten begünstigt wird.

Die Sepharose-Protein A Methode erforderte ferner nur einen geringen zeitlichen Aufwand (etwa 2 Std. gegenüber 5 - 8 Std. bei der Co-Präzipitationsmethode bzw. 8 - 12 Std.

bei der Doppel-Präzipitationsmethode). Dieser Umstand bedingt, daß etwaige proteolytische Prozesse während der Fällungsperiode stark eingeschränkt werden. Durch die richtige Anwendung von Protein A-Sepharose zeigte sich weiterhin, daß eine Kontamination des Immunpräzipitats mit Fremdproteinen (sichtbar bei der SDS-gelelektrophoretischen Analyse) stark abnahm. Dies hängt wahrscheinlich mit der effektiveren Waschmöglichkeit des an Protein A gekoppelten Antikörper-Antigen-Komplexes zusammen (29). Viel Aufwand ist allerdings anfänglich erforderlich bis die richtigen Präzipitationsbedingungen und vor allem das richtige Verhältnis von Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose gefunden sind. Bei den folgenden Versuchen wurde ein 10 - 15 facher Überschuß an Antikörpern eingesetzt als notwendig gewesen wäre eine entsprechende α -Glucosidase Menge aus Menschenleber zu präzipitieren (1 mg IgG präzipitierte ca. 150 mU α -Glucosidase, 1 ml Antiserum enthielt ca. 20mg IgG). Ein Überschuß von 10 - 20% Protein A-Sepharose wurde wiederum zur Kopplung des Hasen IgG verwendet (25 mg IgG wird von ca. 1 ml sedimentiertem Gel gebunden, vgl. 29). Bei der Verwendung von zuviel Sepharose-Protein A Gel traten zum Teil erhebliche nicht auswaschbare Kontaminationen (s.o.) auf. Die Ergebnisse waren dann nicht reproduzierbar. Letzlich kann als Vorteil der Protein A-Gel Methode auch der Antikörper einsparende Effekt genannt werden.

Vor der Immunopräzipitation von α -Glucosidase aus Fibroblasten wurden Fibroblastenkulturen nach Konfluenz 24 Std. in Gegenwart von ^3H -leucin inkubiert (30) und anschließend geerntet. Die radioaktiv markierten Zellen wurden zunächst mit Ultraschall aufgebrochen (5 x 5 sec Stufe 2, Branson Sonifier, Modell S 75). In einem Teil der Probe wurden Protein (31) und die Enzymaktivität bestimmt. Gleichzeitig wurde die restliche Probe mit Triton X-100-haltigem Puffer (2% Triton X-100, 0,1 M Na-phosphat, pH 7,5) lysiert, die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (30 000 x g, 20 min). Zum Überstand (gewöhnlich etwa 1 ml) wurden 20 μl

Antiserum zugefügt und 10 min. leicht geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl verdünntes Sepharose-Protein A Gel (1 Teil sedimentiertes Gel und 4 Teile Triton X-100-haltiger Puffer, s.o.) zugegeben und 30 min. nochmals leicht geschüttelt. Das Gel wurde dann durch Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert. Das sedimentierte Gel wurde 2 x mit Triton X-100 haltigem Puffer und 2-3 x mit Detergenz-freiem Puffer (0,1 M Na-phosphat, pH 7,5) gewaschen. Dann wurde das Gel in 30 µl 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 5% SDS suspendiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Schütteln wurde im Überstand die Radioaktivität bestimmt und ein Aliquot (etwa 40 - 50 000 cpm) mit Hilfe der SDS-gel-elektrophorese analysiert (vgl. Tabelle III).

2.3.3. Quantitative und qualitative Analyse des mit Antikörpern gegen α -Glucosidase immunopräzipitierten radioaktiven Materials.

Der Antikörper gegen die mit SDS vorbehandelte α -Glucosidase (s. o., Kap. 2.3.1) brachte zunächst bei Anwendung der Co-Präzipitationsmethode (s. o., Kap. 2.3.2.) deutlich andere Ergebnisse als der Antikörper gegen das intakte Enzym. Nach Einführung der Sepharose-Protein A-Methode waren jedoch diese Unterschiede verschwunden. Deshalb kann hier die Frage nicht beantwortet werden, ob die Antikörper gegen die SDS-desintegrierte α -Glucosidase prinzipiell besser sind oder ob die Unterschiedlichkeiten bei der Co-Präzipitationsmethode lediglich die bei Antikörper-Präparationen auftretende Unterschiede widerspiegeln. In den folgenden Untersuchungen wurde ausschließlich der Antikörper gegen das desintegrierte Enzym verwendet.

In Tabelle III sind zunächst Angaben enthalten, welche Fibroblastenkulturen untersucht wurden. Neben den Fibroblasten von normalen Menschen wurden Fibroblasten untersucht bei denen der Spender entweder homozygot oder heterozygot ein Mangel der sauren α -Glucosidase hatte. Die Pompesche Erkrankung, wie die homozygote Form auch

genannt wird, zeichnet sich durch drei Formvarianten aus: infantil, juvenil und adult, je nachdem mit welchem Alter die Krankheit ad exitum führt. Wie in Spalte 1 ersichtlich, hatten die verwendeten Kulturen durchschnittlich den gleichen Proteingehalt. Dieser Umstand ist für einen Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten von Fibroblastenkulturen wichtig, da bekannt ist, daß die spezifische Aktivität der sauren α -Glucosidase bei Zunahme des Proteingehalts der Kultur auch zunimmt (32). Die Enzymbestimmungen der unterschiedlichen Zellvarianten (Spalte 2) bestätigten die Befunde anderer Autoren, daß die spezifische Enzymaktivität in heterozygoten Morbus Pompe-Fibroblasten gegenüber Kontrollen durchschnittlich etwas erniedrigt ist (33, 34). Bei den Fibroblasten von Patienten mit Pompescher Erkrankung ist je nach Formvariante ca. 0,5 - 10% der spezifischen α -Glucosidase Aktivität von Kontrollen noch vorhanden. Manche Autoren vermuten (7, 8, 9), daß die erhöhte Restaktivität der Grund für die unterschiedliche Lebenserwartung der Patienten sein könnte.

In Spalte 3 von Tabelle III wird gezeigt, daß es gelang in allen Kulturen etwa die gleiche Menge ^3H -Leucin in TCA-fällbares Protein einzubauen. Die Gesamtmenge an zugegebenen ^3H -Leucin in Kulturmedium entsprach jeweils ca. 310×10^6 cpm. Dies bedeutet, (vgl. Tabelle III) daß der Vorrat (Pool) an freiem Leucin im Wachstumsmedium etwa 7-10 x größer war als die Leucinmenge, die in 24 Stunden eingebaut wurde oder, daß demnach während der 24-stündigen Markierungsdauer ein kontinuierlicher Einbau von radioaktivem Leucin stattfand. Diese Feststellung ist wichtig im Hinblick auf die später zu untersuchende Frage, ab wann eine Degradation der radioaktiv markierten α -Glucosidase einsetzt, ohne daß gleichzeitig eine Neusynthese stattfindet.

Die mit Antikörpern gegen saure α -Glucosidase präzipitierbare Menge an Radioaktivität ist als Prozentsatz der gesamten TCA-fällbaren Radioaktivitätsmenge in Spalte 4 angegeben. Entgegen den Erwartungen, die sich aus Tabelle III

Tabelle III: Übersicht der verwendeten radioaktiv markierten Fibroblastenkulturen. Ergebnisse der Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen saure α -Glucosidase. Angegeben ist jeweils der Durchschnittswert der Untersuchungen.

Zellkultur (Anzahl der Untersuchungen)	Proteingehalt spez. Aktivität der Zellkultur d. α -Glucosidase (mg) (mU/mg) ¹	eingebaute TCA-fällbare Radioaktivität (cpm)	immuno- präzipitier- bare Radio- aktivität (% d. Ges.)	auf SDS-Elektrophorese als α -Glucosidase definier- barer Radioaktivitätsanteil (% des Elektrophorese Auftrags)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
A) Human Fibroblasten wurden nach Konfluenz (etwa 8 Tage nach Subkultur) 24 Std. mit ^3H -Leucin radioaktiv markiert.				
Kontrollen (12)	2,2	1,82	35 x 10 ⁶	0,28
Heterozygote (Morbus Pompe):				
infantiler Typ (4)	1,8	1,24	43 x 10 ⁶	0,18
juveniler Typ (4)	1,9	1,21	29 x 10 ⁶	0,23
adulte Typ (0)	-	-	-	-
Homozygote (Morbus Pompe):				
infantiler Typ (4)	2,3	0,01	41 x 10 ⁶	0,14
juveniler Typ (4)	2,1	0,03	47 x 10 ⁶	0,20
adulte Typ (6)	1,7	0,17	31 x 10 ⁶	0,18
B) Human Fibroblasten wurden nach Konfluenz 24 Std. mit ^3H -Leucin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Kulturen 48 Std. mit einem Überschuß an kaltem Leucin inkubiert.				
Kontrollen (4)	2,4	1,87	36 x 10 ⁶	0,24
Heterozygote (Morbus Pompe)				
infantiler Typ (4)	2,1	1,23	27 x 10 ⁶	0,20
juveniler Typ (2)	2,2	1,25	32 x 10 ⁶	0,22
adulte Typ	-	-	-	-
Homozygote (Morbus Pompe)				
infantiler Typ (2)	2,4	0,01	36 x 10 ⁶	0,08
juveniler Typ (4)	2,2	0,03	35 x 10 ⁶	0,12
adulte Typ (4)	1,9	0,17	31 x 10 ⁶	0,17

¹) Enzymaktivität angegeben als Spaltung von MUF-Glu; 1 Unit = 1 uMol/mm

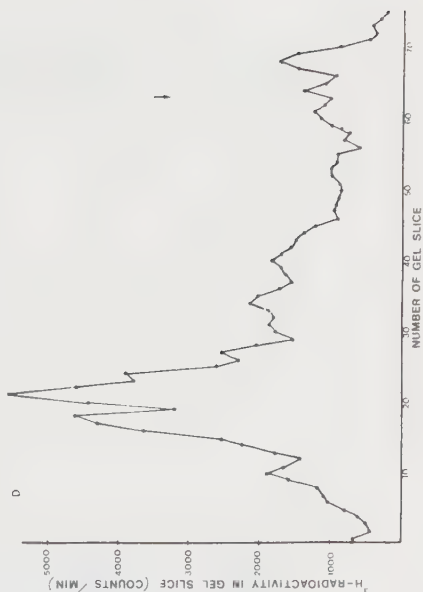
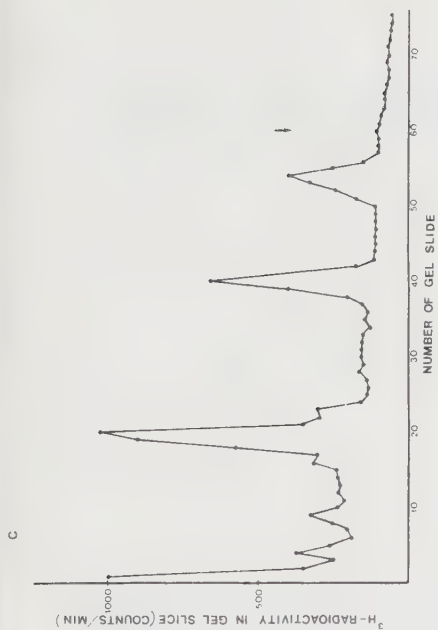
Spalte 2 ergeben, ist keine Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der jeweils mit Antikörper fällbaren Radioaktivität vorhanden. Die SDS-gelelektrophoretische Analyse der Immunopräzipitate bot hierfür eine Erklärung.

In Abb. 6 b und c sieht man zunächst, daß bei Kontroll-Fibroblasten wie auch bei den Heterozygoten-Fibroblasten ein klares Markierungsmuster entstand. Drei prominente Gipfel mit scheinbaren Molekulargewichten von ca. 13 000, 22 000 und 48 000 sind vorhanden. Beim Vergleich mit der elektrophoretischen Analyse von gereinigter saurer α -Glucosidase (Abb. 6 a) korrelieren die beiden großen Radioaktivitätsgipfel im niedrigen Molekulargewichtsbereich (13 000 und 22 000) mit den kleinen Gipfeln im Densitogramm. Ferner sind im Markierungsmuster von Abb. 6 b und c zwei kleine Gipfel mit scheinbaren Molekulargewichten von ca. 102 000 und 148 000 zu sehen. Diese korrelieren mit den beiden prominenten Banden des Densitogramms (Abb. 6 a). Zur Übersicht ist in Abb. 6 d das SDS-elektrophoretische Markierungsmuster ganzer Fibroblasten (Kontrolle) nach 24-stündigem ^3H -Leucineinbau gezeigt.

Abb. 6 (Seite 31)

SDS-gelelektrophoretische Analyse auf 15%igen Polyacrylamid-Gelen.

- A. Isolierte saure α -Glucosidase: Densitogramm der Enzymproteine nach Anfärbung mit Coomassie-Blue(A₅₇₈);
- B. Immunopräzipitierte saure α -Glucosidase aus Kontroll-Fibroblasten, die in vivo mit ^3H -Leucin 24 Std. markiert wurden.
- C. Immunopräzipitierte saure α -Glucosidase aus Heterozygoten-Morbus Pompe-Fibroblasten, die in vivo mit ^3H -Leucin 24 Std. markiert wurden;
- D. Ganze Fibroblasten (Kontroll-Kultur), die 24 Std. mit ^3H -Leucin markiert wurden.



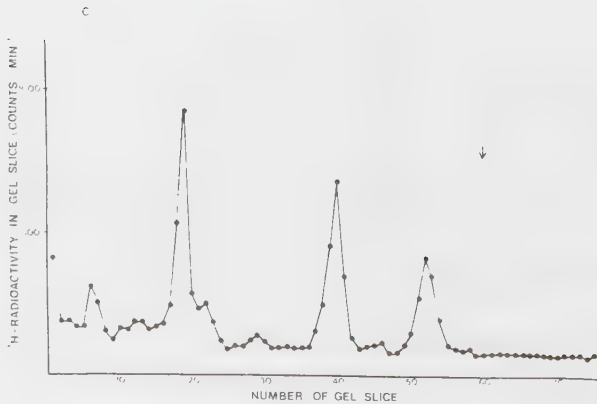
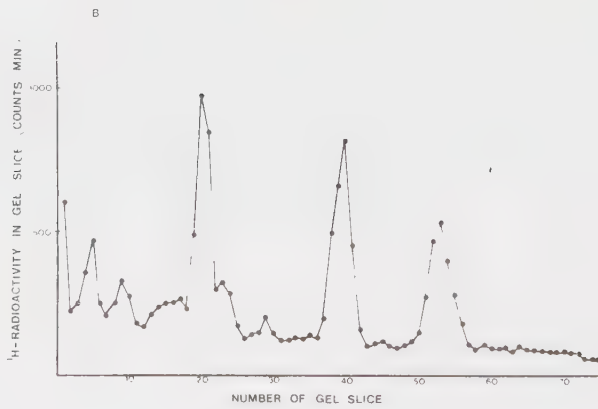
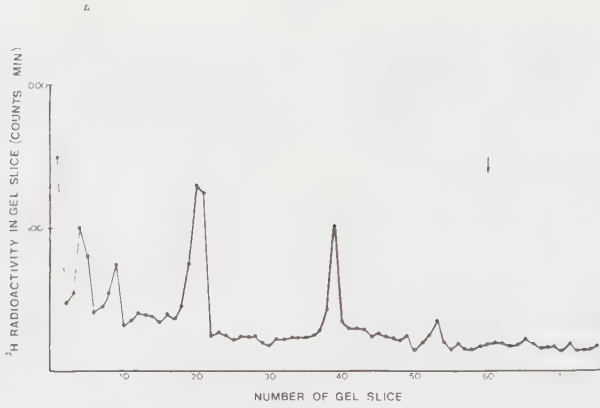


Abb. 7 (Seite 32)

SDS-gelelektrophoretische Analyse von Polypeptiden, die mit Antikörper gegen saure α -Glucosidase aus Fibroblasten von Morbus Pompe Patienten präzipitiert werden. Die Fibroblasten wurden in vivo mit ^3H -Leucin 24 Std. markiert.

- A. infantiler Morbus Pompe Typ;
- B. juveniler Morbus Pompe Typ;
- C. adulter Morbus Pompe Typ.

Betrachtet man die SDS-gelelektrophoretische Analyse des Immunopräzipitats aus radioaktiv-markierten Morbus Pompe-Fibroblasten (Abb. 7), so ist ein Markierungsmuster zu erkennen, welches dem Ergebnis von Kontroll- bzw. Heterozygoten-Fibroblasten weitgehend ähnelt. Dies gilt für alle Formvarianten der Pompeschen Erkrankung. Prominente Gipfel mit scheinbaren Molekulargewichten von 13 000, 22 000 und 48 000 sind sichtbar. Kleine Gipfel sind im Molekulargewichtsbereich von 102 000 und 148 000 vorhanden. In Tabelle III ist in Spalte 5 aufgeführt, wieviel Prozent der aufgetragenen Radioaktivität jeweils in den 5 angegebenen Gipfelfractionen wiederauffindbar ist. Durchschnittlich wurde 20 - 40% des Auftrags nicht mehr gefunden. (s. Diskussion)

Zur Untersuchung ob die in Abb. 6 und 7 gezeigten elektrophoretischen Markierungsmuster durch die Immunpräzipitation von radioaktiv markierter α -Glucosidase bedingt sind oder Artefakte darstellen, wurden unterschiedliche Kontrollen durchgeführt. Durch die Verwendung von Hasen-Normalserum und Hasen-Antiserum gegen Rinderserumalbumin konnte etwa

0,04 - 0,08% der in Fibroblasten als ^3H -Leucin eingebauten Radioaktivität präzipitiert werden. Die SDS-gelelektrophoretische Analyse zeigte hier jedoch keine Ähnlichkeit zu den Immunpräzipitationen bei Verwendung von Antiserum gegen α -Glucosidase. Vielmehr war ein nicht definierbares Markierungsmuster zu sehen. Nur 10 - 20% der aufgetragenen Radio-Radioaktivität konnte wieder auf dem Gel gefunden werden.

Durch Anwendung anderer Versuchsbedingungen konnte, wie in Abb. 8 b zu sehen ist, das SDS-elektrophoretische Markierungsmuster des mit Antikörpern gegen α -Glucosidase gewonnenen Immunpräzipitats stark verändert werden. So sieht man bei Verwendung von 7,5%-igen Gelen ein Markierungsmuster, welches mit dem Proteinbandenmuster der isolierten α -Glucosidase (Abb. 8 a) stark korreliert. Der prominente Radioaktivitätsgipfel mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 148 000 zeigt dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit wie eine der Hauptproteinbanden im Densitogramm der isolierten α -Glucosidase. Auch die kleineren Radioaktivitätsgipfel mit scheinbaren Molekulargewichten von 102 000 und 22 000 haben eine entsprechende Proteinbande im Densitogramm. Im Molekulargewichtsbereich von 13 000 fehlt jedoch ein korrelierender Radioaktivitätsgipfel, auch ist im Bereich von 48 000 kein Radioaktivitätsgipfel sichtbar, wie im Falle des Gebrauchs von 15%-igen Gelen (vgl. Abb. 6 und 7).

In Abb. 9 ist zu erkennen wie der pH das SDS-gelelektrophoretische Markierungsmuster der immunpräzipitierten α -Glucosidase verändert.

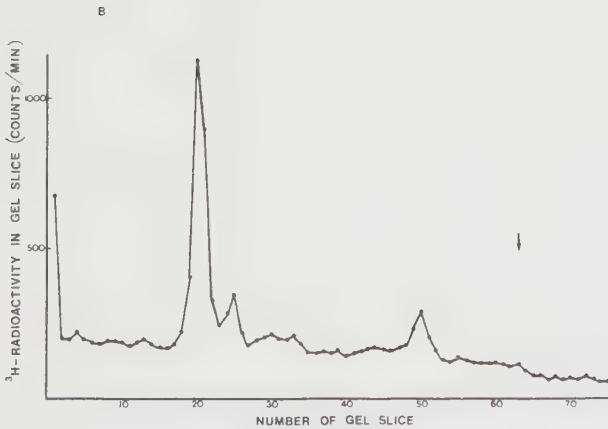
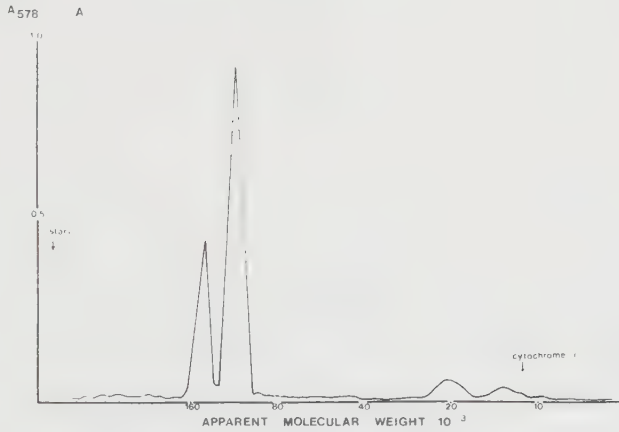


Abb. 8

SDS-gelelektrophoretische Analyse auf 7,5% igen Polyacrylamid-Gelen.

A. vgl. unter Abb. 6 A.

B. vgl. unter Abb. 6 B.

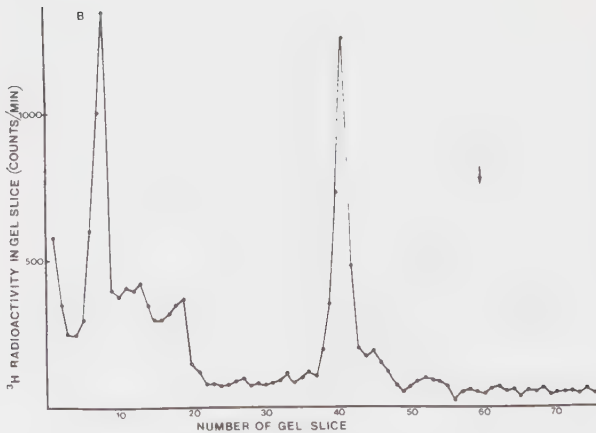
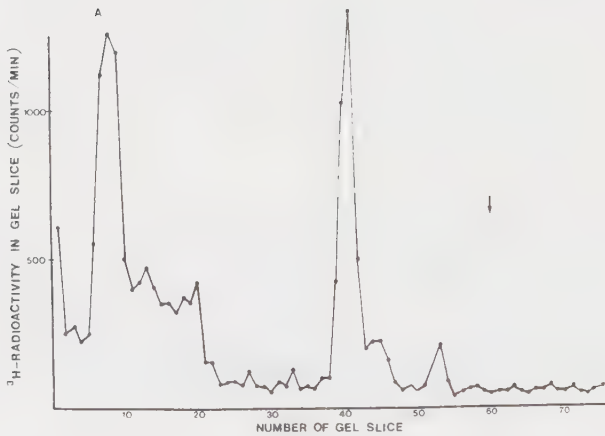


Abb. 9

SDS-gelelektrophoretische Analyse bei pH 7,2. Immunopräzipitierte saure α -Glucosidase aus Kontroll-Fibroblasten, die in vivo

- A. 24 Std. mit ^3H -Leucin markiert wurden, und
B. 24 Std. mit ^3H -Leucin markiert wurden und anschließend 48 Std.

in Gegenwart hoher Leucin Konzentrationen weiterinkubiert wurden (Leucin-Chase).

Trotz der Verwendung von 15%-igen Gelen sind die prominenten Gipfel mit scheinbaren Molekulargewichten von 48 000 und 13 000 nahezu verschwunden wenn ein pH von 7,2 statt 8,0 bei der Elektrophorese verwendet wurde (vgl. Abb. 9 mit Abb. 6 und 7). Lediglich zwei prominente Gipfel im Molekulargewichtsbereich von 22 000 und 110 000 sind sichtbar.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Die Antikörper gegen die saure α -Glucosidase aus Humanleber präzipitieren aus Fibroblasten, die 24 Std. kontinuierlich mit ^3H -Leucin radioaktiv markiert wurden (s. o), radioaktiv markierte Proteine, die je nach Analysebedingungen die gleiche SDS-gelelektrophoretische Beweglichkeiten aufweisen wie die Proteinbestandteile der isolierten α -Glucosidase aus Leber. Wahrscheinlich sind die markierten Proteine Bestandteile der sauren α -Glucosidase aus Fibroblasten. Da die immunopräzipitierten, markierten Proteine auch unter identischen Versuchsbedingungen in einem sehr unregelmäßigen Verhältnis zueinander vorkommen (vgl. z.B. Abb. 6 b und c mit Abb. 7), scheint es, wie auch in Kapitel 2.2.2. angedeutet, nicht ausgeschlossen, daß die Produkte mit scheinbaren Molekulargewichten von 22 000, 48 000, 102 000 und 148 000 letztlich polymere Formen des kleinsten Proteins mit Molekulargewicht von ca. $13\,000 \pm 2000$ darstellen. Demnach wären die Produkte mit höherem Molekulargewicht Ausdruck einer vorläufig noch unkontrollierbaren Polymerbildung (s. Diskussion).

Die Frage, ob das Leberenzym nach Immunopräzipitation in ähnliche Bestandteile zerlegt werden kann wie das Fibroblastenzym konnte in Ermangelung einer radioaktiv markierten α -Glucosidase aus Leber bisher nicht kontrolliert werden. Versuche, bei denen die Leber- α -Glucosidase mit Antikörper präzipitiert wurde und anschließend eine SDS-gelelektrophoretische Analyse des Präzipitats durchgeführt wurde, zeigten tatsächlich bei entsprechenden Bedingungen ein Verschwinden einer Hauptproteinbande mit scheinbarem Molekulargewicht von 102 000 (vgl. Abb. 6a). Gleichzeitig

trat eine verstärkte Proteinfärbung hauptsächlich im Molekulargewichtsbereich von 22 000 auf. Da jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, daß es sich hierbei um L-Ketten des IgG-Moleküls handelte, wie Vergleichsuntersuchungen mit isolierten Immunoglobuline zeigten, kann bisher nur vermutet werden, daß die saure α -Glucosidase aus Humanleber in ähnlicher Weise wie das Fibroblasten-enzym zerlegt wird, wenn sie mit Antikörpern präzipitiert wird.

Obwohl es nicht zweifelhaft erscheint, daß die in den Abbildungen 6 b und c, 7, 8 b und 9 gezeigten SDS-gel-elektrophoretischen Analysen immunpräzipitierte α -Glucosidase oder α -Glucosidase Untereinheiten darstellen, so ist es jedoch unverständlich wieso auch bei sämtlichen Fibroblastenkulturen von Patienten mit Pompescher Erkrankung radioaktiv markierte α -Glucosidase bzw. Enzym-Untereinheiten immunpräzipitiert werden (Abb. 7). Dieses Ergebnis wäre nur zu verstehen, wenn beispielsweise angenommen wird, daß zwar Untereinheiten der sauren α -Glucosidase hergestellt werden, diese sich jedoch nicht zu einem aktiven Enzym-molekül assemblieren können bzw. im assemblierten Zustand keine (infantiler Typ) oder eine verringerte (adulter Typ) Enzymaktivität besitzen.

Frühere Untersuchungen anderer Autoren zeigten, daß bei der infantilen Form der Pompeschen Erkrankung keine mit Antikörpern gegen saure α -Glucosidase kreuzreagierende Proteine vorhanden sind (10, 14, 16). Bei Patienten mit der adulten Form von Morbus Pompe konnten Brown et al. (10) zeigen, daß die Restaktivität an saurer α -Glucosidase durch eine entsprechend geringere Menge an Enzymmolekülen erzeugt wird, die sonst die gleichen physiko-chemischen Eigenschaften besitzen wie bei Kontrollen (vgl. auch 9). Dies bedeutet, wenn, wie in Abb. 7 und Tabelle III dokumentiert wird, radioaktiv markierte Polypeptide mit Antikörpern gegen die saure α -Glucosidase aus Fibroblasten von Patienten mit Morbus Pompe präzipitiert werden, diese wahrscheinlich teilweise

einem schnellen Abbau unterworfen sein müssen oder anders aus der Zelle beseitigt werden. Daß dies tatsächlich der Fall ist, erkennt man in Tabelle III B. Fibroblasten wurden nach Konfluenz zunächst 24 Std. in Gegenwart von ^3H -Leucin kontinuierlich markiert (s. o.). Anschließend wurde ein Chase (Überschuß) von nicht markiertem Leucin 48 Std. gegeben. Bei den Kontrollen ist zunächst zu erkennen, daß sowohl die eingebaute TCA-fällbare Radioaktivitätsmenge (Spalte 3), wie auch die immunpräzipitierbare Radioaktivitätsmenge (Spalte 4) und der als α -Glucosidase definierbarer Radioaktivitätsanteil bei der SDS-Elektrophorese (Spalte 5) sich nicht wesentlich verändern, mit oder ohne Chase. Auch das SDS-elektrophoretische Markierungsmuster des Immunopräzipitats zeigte keine wesentlichen Veränderungen (vgl. Abb. 9 b).

Bei der Untersuchung der Heterozygoten-Fibroblasten änderte sich ebenfalls nichts Wesentliches nach Gabe des Leucin-Chase (Tabelle III). Bei den Fibroblasten von Patienten mit Morbus Pompe ist jedoch deutlich ein Unterschied vor und nach Gabe des Leucin-Chase sichtbar. Der Anteil an TCA-fällbarer Radioaktivität, der durch Antikörper gegen α -Glucosidase präzipitiert und als α -Glucosidase Untereinheit auf der SDS-Elektrophorese identifiziert werden konnte, nimmt stark ab. Hierbei ist bei der adulten Pompe-Variante die relativ geringste Abnahme nach Leucin-Chase vorhanden (ca. 38%). Bei dem infantilen Pompe-Typ ist die Abnahme am stärksten (ca. 84%). Der juvenile Pompe-Typ liegt etwa dazwischen (Abnahme ca. 61%). Dieses Ergebnis bedeutet, daß bei den Patienten mit Morbus Pompe eine Translation von Polypeptiden stattfindet, die dieselben antigenen Eigenschaften besitzen wie die Untereinheiten der sauren α -Glucosidase. Diese Polypeptide werden jedoch aus einem noch nicht geklärten Grund je nach Pompe-Variante unterschiedlich schnell abgebaut bzw. sonstwie aus der Zelle eliminiert.

In diesem Zusammenhang erscheint es noch bemerkenswert, daß durch Multiplikation des als saure α -Glucosidase identifizierbaren Radioaktivitätsanteils einer radioaktiv markierten Fibroblastenkultur (Tabelle III, Spalte 4 und 5) mit der spezifischen α -Glucosidase Aktivität (Tabelle III, Spalte 2) eine Größe entsteht, die insbesondere im Falle des Leucin-Chases (Tabelle III B) ein leichtes Zuordnen einer Zellkultur zu einem bestimmte Zelltyp gestattet. Eventuell kann hieraus eine Methode entwickelt werden, die auch bei Amnionzellen eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Krankheitstyp zuläßt (s. Diskussion).

3. Diskussion

I. Die in dieser Arbeit beschriebenen affinitätschromatographischen Verfahren zur Isolierung der sauren α -Glucosidase aus Humanleber unterscheiden sich nicht prinzipiell von den sonst in der Literatur beschriebenen Verfahren (10, 14, 15, 16, 37). Es zeigte sich jedoch im Verlauf der Experimente, daß kleine Modifikationen des Isolierungsvorgangs große Erleichterungen bringen. So wirkte sich bei der Grob- und Feinreinigung von Humanleber insbesondere der Einsatz von Cholat nach der Homogenisation und die Reduktion des Proteinauftrags bei der Affinitätschromatographie auf Sephadex G-100 sehr positiv aus. Bei der Darstellung kleiner Enzymmengen war vor allem die Beseitigung von Fettanteilen neben der Reduktion des Proteinauftrages bei der Chromatographie wichtig. In diesem Zusammenhang erscheint es fraglich, ob die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Darstellung kleiner Mengen von saurer α -Glucosidase mittels extra hergestellter Gele (15, 37) gegenüber der hier beschriebenen Affinitätschromatographie auf käuflich erworbenem Sephacryl S-200 Gel wirklich Vorteile bringt. Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Turanose-Sepharose Affinitäts-Gel bot zumindest keinerlei Vorteil. Die berichtete Anreicherung und Ausbeute an saurer α -Glucosidase sind vergleichsweise hoch und entsprechen den erst neulich veröffentlichten Ergebnissen von Murray et al. (10).

Die Trennung der gereinigten Enzympräparation aus Humanleber in zwei Isoenzyme sowohl bei der gewöhnlichen Elektrophorese als auch bei der isoelektrischen Fokussierung ist bisher nicht beschrieben worden. Anders als bei Swallow et al. (38) können die Isoenzyme auch ohne "Affinitäts-elektrophorese" sichtbar getrennt werden. Da diese Methode im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt wurde, ist es nicht unwahrscheinlich, daß eine weitere Auftrennung der Enzympräparation in Isoenzyme mittels Affinitäts-elektrophorese möglich ist.

Keines der beobachteten Isoenzyme war besonders instabil

bei kurzer Lagerung in der Kälte, demnach sind die gefundenen Isoenzyme nicht mit den von Shin-Bühring et al. (30) berichteten Isoenzymen vergleichbar. Möglicherweise sind die Isoenzyme jedoch mit den von Soyama et al. (40) beobachteten Leberisoenzymen identisch. Dieser zeigte mittels Elektrophorese auf Cellulose-Azetat-Streifen, daß zwei Leberisoenzyme existieren. Eine Bestätigung seines Ergebnisses mittels isoelektrischer Fokussierung liegt jedoch noch nicht vor. Bei einer mit der in dieser Arbeit ähnlichen Präparation von saurer α -Glucosidase aus Humanleber fanden Murray et al. (10) vier - fünf Isoenzyme bei der isoelektrischen Fokussierung. Diese unterschieden sich im Kohlenhydratgehalt und konnten bei der gewöhnlichen Polyacrylamid-Elektrophorese nicht aufgetrennt werden. Dieses Ergebnis konnte nicht bestätigt werden. Eventuell handelte es sich bei Murray et al. um "Isoenzyme", die durch Autodigestion von Kohlenhydratanteilen des Enzyms entstanden sind. Die von Murray et al. angeführten Gründe, daß ihr Elektrofokussierungsverfahren besser sei als alle bisherigen, erscheinen fragwürdig.

Die beobachteten Stabilitätseigenschaften der isolierten α -Glucosidase (vgl. Kap. 2.2.1.) sind schlechthin verwirrend. Wieso nimmt etwa die Enzymaktivität während langer Lagerung bei niedrigen Salz- bzw. Enzymkonzentrationen oder bei Temperaturen über 5° C ab, wenn sie in Abwesenheit von Albumin gemessen wird. Bei Anwesenheit von Albumin blieb die Aktivität hingegen annähernd konstant oder nahm relativ gering ab. Koster et al. (39) berichteten, daß eine Albumin- oder Protein-Umgebung für die saure α -Glucosidase sowohl stabilisierend als auch aktivierend wirkt. Anscheinend vermag Albumin jedoch auch eine teilweise Reassemblierung der elektrophoretisch nachweisbaren Enzymzerfallsprodukte zu einem vollwertigen Enzym zu erreichen.

Der nur limitierte Zerfall der isolierten Enzympräparation in zwei definierte Polypeptide korrelierte gut mit dem Enzymaktivitätsverlust in Abwesenheit von Albumin. Da

Albumin diesen Aktivitätsabfall oft gänzlich aufhob, und da bei der SDS-elektrophoretischen Analyse der Zerfallsprodukte diese scheinbare Molekulargewichte wie Untereinheiten-Strukturen von intakter α -Glucosidase aus Fibroblasten aufwiesen (siehe unten, II), kann angenommen werden, daß bei diesem Zerfall vermutlich kein proteolytischer Prozess beteiligt ist. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, daß der Kohlenhydratanteil des Enzyms bzw. der Untereinheiten durch Autodigestion teilweise zerstört wird und deshalb das Enzym zerfällt. Dies würde bedeuten, daß der Kohlenhydratanteil letztlich für die richtige Enzymassemblierung notwendig ist. Da bekanntlich Albumin keinen Kohlenhydratanteil besitzt, könnte die Funktion von Albumin als "Reassemblierungseinheit" aus der Fähigkeit resultieren als Vehikel dienen zu können (z. B. bei Insulin). Letztlich wäre es in diesem Zusammenhang denkbar, daß die am Zuckeranteil angedauten Untereinheiten der α -Glucosidase auch als Autodigestions-Inhibitoren wirken und dadurch der beobachtete limitierte Zerfall an Enzymmolekülen unter normalen Lagerbedingungen erklärt wird (vgl. Kap. 2.2.).

II. Bei der Untersuchung der Untereinheiten-Struktur der sauren α -Glucosidase müssen folgende Ergebnisse berücksichtigt werden:

a. Die isoelektrische Fokussierung und die SDS-Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gelen zeigten, daß bei Analyse der isolierten Enzympräparation zwei definierte Proteinbanden zusätzlich auftreten, wenn das Enzym zuvor entsprechend behandelt wurde (Lagerbedingungen siehe Kap. 2.2.2.). Wie erwähnt, korrelierte die Zunahme dieser Banden mit der Abnahme an Enzymaktivität. Das scheinbare Molekulargewicht dieser "Zerfallsprodukte" lag bei 13 000 $\pm$ 2000 und 22 000 $\pm$ 3000. Da das Verhältnis dieser Produkte zueinander von Faktoren wie z. B. der Gelvernetzung abhängig war, wurde vermutet, daß das schwerere Polypeptid eventuell die dimere Form des kleineren Partners darstellt.

b. Anhand der SDS-gelelektrophoretischen Analyse der isolierten Enzympräparation wurde ferner dargestellt, daß die zwei Hauptproteinbestandteile der sauren α -Glucosidase scheinbare Molekulargewichte von ca. $148\,000 \pm 15\,000$ und $102\,000 \pm 10\,000$ besitzen. Da auch bei diesen Proteinbanden das Verhältnis zueinander von Faktoren wie pH, Gelvernetzung etc. abhängig war, wurde hier spekuliert, daß vielleicht eine gemeinsame Untereinheiten-Struktur mit einem Molekulargewicht von ca. 50 000 existiert, welche unter gegebenen Verhältnissen entweder Dimere oder Trimere bilden kann. Dies wurde später bestätigt.

c. Bei der SDS-elektrophoretischen Analyse der mit Antikörper präzipitierten sauren α -Glucosidase aus in vivo radioaktiv markierten Fibroblasten waren drei deutliche Radioaktivitätsgipfel im Molekulargewichtsbereich von ca. 13 000, 22 000 und 48 000 zu erkennen. Diese "Untereinheiten" konnten durch Veränderungen der Versuchsbedingungen Aggregate bilden mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität, wie die unter b. genannten Hauptproteinbestandteile der isolierten sauren α -Glucosidase. Da diese Untereinheiten auch bei identischen Versuchsbedingungen in keinem festen Verhältnis zueinander vorlagen, wurde vermutet (vgl. Kap. 2.3.3.), daß die Untereinheiten-Strukturen im Molekulargewichtsbereich von $22\,000 \pm 3000$ und $48\,000 \pm 4000$ letztlich Dimere bzw. Tetramere der kleinsten Untereinheiten-Struktur darstellen. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß der nicht mehr auffindbare Teil des radioaktiven Elektrophorese-Auftrags (durchschnittlich 30%) das unregelmäßige Verhältnis der Untereinheiten zueinander erklären könnte. Dies erscheint jedoch vor allem deshalb zweifelhaft, da bei Kontrolluntersuchungen mit unspezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte, daß der Hauptteil (80 - 90%) des in diesem Falle präzipitierten radioaktiven Materials auch während der Elektrophorese verloren ging und mengenmäßig mit dem obigen Verlust korrelierte. Eventuell handelt es sich hierbei nicht um Polypeptide sondern um Fette (^3H -Leucin kann bekanntlich in verzweigt-kettige Fettsäuren eingebaut

werden), die unspezifisch bei der angewandten Immuno-präzipitationsmethode mitisoliert werden. Zusammenfassend kann hier die Hypothese aufgestellt werden, daß die saure α -Glucosidase vermutlich aus einer einheitlichen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 13 000 $\pm$ 2000 besteht.

Als weiteres Argument dafür, daß vermutlich nur eine Untereinheiten-Struktur bei der sauren α -Glucosidase existiert, ist der Umstand, daß faktisch nur eine N-terminale Aminosäure (Glutaminsäure) gefunden wurde (85 - 90%). Die kleinen Mengen an Valin, Alanin und Glycin die ebenfalls gefunden wurden, deuten eventuell auf das Vorhandensein von Iso-Untereinheiten oder teilweise proteolytisch abgebaute Untereinheiten hin. Gleichfalls wäre eine Kontamination durch Fremdproteinen denkbar. Diesbezüglich konnte jedoch weder bei der Gelfiltration noch bei den unterschiedlichen elektrophoretischen Untersuchungen etwas festgestellt werden.

Bruni et al. (41) äußerten schon früher die Vermutung, daß die saure α -Glucosidase eventuell aus einer einheitlichen Untereinheit besteht. Sie beobachteten auch, daß diese Untereinheiten eine starke Aggregationsneigung besitzen bei dem pH, der im Rahmen dieser Untersuchungen bei der SDS-Elektrophorese gewöhnlich angewendet wurde. Allerdings untersuchten Bruni et al. die saure α -Glucosidase aus Rinderleber und vermuteten ein Molekulargewicht von 25 000 $\pm$ 3000 für die kleinste Untereinheiten-Struktur.

III. In den Fibroblasten von Patienten mit Morbus Pompe konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, daß eine Translation von Polypeptiden stattfindet, die 1. mit Antikörper gegen saure α -Glucosidase aus Humanleber präzipitiert werden können und 2. auf der SDS-Elektrophorese eine ähnliche Mobilität besitzen wie immunpräzipitierbare Untereinheiten der α -Glucosidase aus Kontroll-Fibroblasten. Diese Polypeptide wurden in den Morbus Pompe Fibroblasten beschleunigt eliminiert, wobei je nach Morbus Pompe Variante

der Eliminierungsprozess unterschiedlich schnell verlief. Am schnellsten war er bei der infantilen Pompe Variante, am langsamsten bei der adulten Pompe Form.

Allgemein können die möglichen Ursachen für eine beschleunigte Eliminierung von Polypeptiden, die den Untereinheiten-Strukturen der sauren α -Glucosidase ähneln, sehr unterschiedlich sein. Es könnte z. B. ein Fehler bei der Translation oder nach der Translation beim Ankoppeln von Kohlenhydraten stattfinden. Der Kohlenhydratanteil von lysosomalen Enzymen soll eine wichtige Rolle bei der Integration in die Lysosomen spielen (40). Der Integrationsprozess der α -Glucosidase in die Lysosomen könnte jedoch auch aus anderen Gründen gestört sein. Ferner ist hier ebenfalls noch an ein Fehler bei der Enzymassemblierung aus Untereinheiten zu denken. Gleichgültig wie der Fehler geartet ist, muß dessen Folge entweder ein beschleunigter Abbau oder die Sekretion der Polypeptide in den extrazellulären Raum sein, wie aus der Tabelle III zu entnehmen ist. Welcher dieser Prozesse letztlich das Verschwinden der Polypeptide verursachte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig entschieden werden, da z. B. mit Antikörpern gegen die α -Glucosidase zwar aus dem Kulturmedium von radioaktiv markierten Fibroblasten von Morbus Pompe Patienten vermehrt radioaktives Material präzipitiert wurde, dieses jedoch bei der SDS-elektrophoretischen Analyse nicht Untereinheiten-Strukturen des Enzyms ähnelte. Eventuell könnten immunologische Urin- oder Blutuntersuchungen bei Patienten mit Morbus Pompe hier weiterhelfen, da im Falle der Sekretion sicherlich vermehrt kreuzreagierende Antigene nachzuweisen wären.

In diesem Zusammenhang wäre auch denkbar, daß die Fehlerhaftigkeit der Polypeptidstrukturen gemäß der Hypothese von Hickman und Neufeld (42) bedingt, daß das veränderte Enzym nicht aus dem extrazellulären Raum in die Lysosomen integriert wird. Hickman und Neufeld vermuteten, daß lysosomale Enzyme zunächst von der Zelle ausgeschieden werden, bevor sie über spezifische Erkennungspunkte auf

der Zelloberfläche in die Lysosomen integriert werden. Reuser et al. (43) konnten jedoch glaubhaft zeigen, daß die saure α -Glucosidase wahrscheinlich nicht über den Umweg des extrazellulären Raums in die Lysosomen aufgenommen werden.

Über die Ursachen, weshalb bei den einzelnen Morbus Pompe Varianten die Eliminationsgeschwindigkeit der mit Antikörper gegen α -Glucosidase präzipitierbaren Polypeptide unterschiedlich ist, kann bisher lediglich spekuliert werden. Vielleicht führt diese Unterschiedlichkeit jedoch dazu, daß Fibroblasten von Patienten mit der adulten Morbus Pompe Form noch etwa 10% der Enzymaktivität von Kontrollfibroblasten besitzen (vgl. Tabelle III). Auch andere Autoren konnten zeigen, daß bei der adulten Pompe Form saure α -Glucosidase Aktivität noch vorhanden ist (7 - 22% Restaktivität) (7 - 10). Reuser et al. (9) beobachteten, daß dieses Enzym dieselben physiko-chemischen und kinetischen Eigenschaften besitzt wie die saure α -Glucosidase aus normalen Zellen. Es scheint in diesem Zusammenhang denkbar, daß die adulte Morbus Pompe Variante die Grundmutationsform darstellt, die auch bei den anderen Morbus Pompe Varianten vorhanden ist. Die schnellere Eliminierungsgeschwindigkeit bei der juvenilen und infantilen Morbus Pompe Variante wäre dann die Folge von Zusatzmutationen (vgl. auch 44). Letztlich mag die durchschnittliche Lebensdauer eines sauren α -Glucosidase Moleküls bis es eliminiert wird, der Grund für die unterschiedlichen Manifestationsformen von Morbus Pompe sein, d. h. letztlich auch die Lebensdauer des Morbus Pompe Patienten bestimmen.

- IV. Wie im Kapitel 2.3.3. schon aufgezeigt wurde, entsteht durch Multiplikation der spezifischen sauren α -Glucosidase Aktivität von Fibroblasten mit dem jeweiligen Prozentsatz an eingebauten ³H-Leucin, der im Enzym gefunden wird, eine Größe, die ein leichtes Zuordnen einer Zellkultur zu einem bestimmten Krankheitstyp gestattet. Auch die Unterscheidung zwischen

normalen und heterozygoten Zellen scheint hierdurch erleichtert. In beiden Fällen kann allerdings erst durch eine größere Anzahl von Untersuchungen dieses vorläufige Ergebnis bestätigt werden. Ob sich diese Differenzierungsmethode auch auf Amnionzellkulturen, also im Rahmen der pränatalen Diagnostik anwenden läßt, ist noch in der Erprobung. Erste Versuchsergebnisse sind diesbezüglich positiv.

In diesem Zusammenhang erscheint es reizvoll, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methodik auch bei der pränatalen Diagnostik von anderen relativ häufigen Stoffwechselkrankheiten wie z. B. der Phenylketonurie (PKU) anzuwenden. Das bei dieser Krankheit fehlende Enzym, die Phenylalaninhydroxylase, läßt sich weder in den Fibroblasten (Amnionzellen) von Patienten noch in Kontrollzellen enzymatisch nachweisen. Nach den Untersuchungen von Cotton et al. (45) fehlt bei Patienten mit PKU wahrscheinlich eine Untereinheit des Enzyms. Durch die hier entwickelte Methodik sind möglicherweise die unterschiedlichen Vorstufen-Polypeptide der Phenylalaninhydroxylase, nach radioaktiver Markierung in vivo, durch Antikörper zu erfassen.

Allgemein dürfte mit der hier geschilderten Methodik jeder Stoffwechseldefekt, der durch ein defektes oder fehlendes Polypeptid hervorgerufen wird, zumindest genauer zu diagnostizieren sein. Die neue Methodik könnte letztlich auch dazu beihelfen Defekte genauer zu charakterisieren oder zu lokalisieren. So wäre es vorstellbar einen Translationsdefekt z. B. bei der sauren α -Glucosidase im Falle von Morbus Pompe zu entdecken, wenn zunächst verschiedene radioaktive Aminosäuren in vivo in die Untereinheiten-Strukturen eingebaut und die Untereinheiten nach Immunopräzipitation sequenziert werden. Ferner wäre vorstellbar Transportdefekte bei kompartimentierten Enzymen (z. B. bei der lysosomalen sauren α -Glucosidase) durch kinetische Untersuchungen aufzuklären.

4. Anmerkungen zur Methodik

4.1. Bestimmung der Aktivität der sauren lysosomalen λ -Glucosidase

Die Bildung von 4-Methylumbelliferon (MUF) aus 4-Methylumbelliferyl- λ -glucopyranosid (MUF-Glu) wurde im wesentlichen nach der von Shin-Buehring et al. (30) beschriebenen Methode bestimmt. Das Enzym-Inkubationsgemisch enthielt, wenn nicht anders aufgeführt 5 mM MUF-Glu, 0,5 mg Humanalbumin/ml, 0,67 M McIlvaine (Phosphat-Citrat) Puffer, pH 4. Die Inkubation fand bei 37⁰ C statt und dauerte gewöhnlich eine Stunde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Na-carbonat Puffer, pH 10,9 beendet.

Die Spaltung von Maltose wurde nach der ursprünglich von Hers (3) entwickelten Methode vorgenommen, die jedoch geringfügig verändert wurde. Das Reaktionsgemisch enthielt 20 mM Maltose, 0,5 mg Humanalbumin/ml, 0,1 M Na-Acetat Puffer, pH 4. Die Inkubation fand bei 37⁰ C statt und wurde durch die Zugabe von 1 M Tris-HCl Puffer pH 8 gestoppt (2:5; v/v). Die Konzentration der entstandenen Glucose wurde nach Zentrifugation des Reaktionsgemisches zur Entfernung eventuell vorhandener denaturierter Proteine enzymatisch bestimmt (spektrophotometrische Messung von NADPH in Gegenwart von NADP⁺, Mg²⁺, ATP, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase). Mit geeigneten Leerwerten wurde jeweils die schon vor der Maltosespaltung anwesende Glucose bestimmt.

Ein Unit (U) entspricht der Enzymmenge, die 1 uMol Substrat (Maltose, MUF-Glu) pro min. unter den angegebenen Bedingungen spaltet.

4.2. Gelfiltration

Falls im Text nicht anders erwähnt, wurde die konstante Durchflußgeschwindigkeit bei der Gelchromatographie durch Peristaltik-Pumpen (Marke Eppendorf bzw. LKB-Produkter AB) gewährleistet. Mit Hilfe des Durchflußphotometers "Uvicord" (LKB-Produkter AB) wurden die Extinktionsänderungen des Säuleneluats bei 280 nm automatisch graphisch registriert. Bei dieser Wellenlänge zeigen alle Peptide und Proteine mit aromatischen Aminosäuren eine befriedigende Absorption.

Bei der gelchromatographischen Bestimmung des Molekulargewichts der isolierten sauren α -Glucosidase auf einer Sephacryl S-200 Säule (vgl. Text zu Abb. 2) wurden folgende Eichproteine verwendet.

Lactatdehydrogenase aus Rinderherz (MG: 140 000),

Albumin aus Rinderserum (MG: 67 000),

Ovalbumin aus Hühnerei (MG: 43 000),

Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas (MG: 25 000)

Cytochrom C aus Pferdeherz (MG: 11 500)

Dextranblau 2000 (MG: 2 000 000),

(alle Eichsubstanzen außer Cytochrom C von Pharmacia Fine Chemicals, Calibration Kit.

Es wurde eine Eichgerade erstellt auf der das Molekulargewicht der lysosomalen α -Glucosidase ermittelt wurde.

4.3. Herstellung eines Affinitätsharzes mit Turanose und Sepharose 6-B Gel

Die Kopplung von Turanose (vgl. Kap. 2.1.2.) an Epoxy-aktivierte Sepharose 6-B erfolgte im wesentlichen nach der allgemeinen Gebrauchsanleitung der Herstellerfirma Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden).

7.5 g epoxy-aktivierte Sepharose wurde mit Wasser versehen und ca. 1 hr stehengelassen. Anschließend wurde das gequollene Harz mit viel Wasser gewaschen und zweimal schnell in 0.01 n NaOH suspendiert. Darauf wurden sofort 2 g Turanose, die in 25 ml 0,01 n NaOH gelöst waren, dem feuchten Harz zugegeben. Die Kopplung erfolgte bei 37° C für 18 hrs in einem Wasserbad mit Schüttler. Darauf wurde das Harz gründlich mit Wasser, Borat Puffer (0,1 M, pH 8) und Acetat Puffer (0,1 M, pH 4) nacheinander gewaschen. Überschüssige Epoxygruppen wurden mit Äthanolamin (1 M) blockiert (Inkubation bei 37° C ca. 10 hrs). Anschließend wurde das Harz nochmals mit Wasser, Borat Puffer und Acetat Puffer wie erwähnt gewaschen und in Borat Puffer (mit Na-azid zur Konservierung) bei 4° C bis zum Gebrauch gelagert. Mit Hilfe des Anthron-Testes konnte gezeigt werden, daß etwa 30% der Epoxygruppen mit Turanose besetzt worden waren.

4.4. Polyacrylamid - Gelelektrophorese

a) Elektrophoretische Analyse nach Bloemendal (22).

Die Disc-Gelelektrophorese wurde entsprechend der Laboranleitung der Firma Pleuger SA ausgeführt Als Puffer für die Anoden- sowie für die Kathodenkammer wurde das Tris-Borat-Puffersystem von Aronsson und Grönwall (46) verwendet.

b) Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen nach Winter et al. (23).

Die Isofokussierung wurde nach der Anleitung der Firma LKB Produkter AB (Application Note 250) ausgeführt. Es wurden jeweils ca. 10 - 30 µg gereinigte und entsalzte lysosomale α -Glucosidase (Fraktion F₁) aufgetragen. Die Gele enthielten 2% Ampholine (pH 3,5 - 10 bzw. pH 4 - 6) und wurden bei 12⁰ C für etwa 10 hrs bei 300 - 800 V fokussiert. Zur Bestimmung des entstandenen pH-Gradienten wurde das Gel in 2 mm Scheiben geschnitten, die über Nacht mit wenig Wasser bei Zimmertemperatur eluiert wurden. Der pH wurde anschließend bestimmt ohne die Scheiben zu entfernen.

c) SDS-Gelelektrophorese nach Segrest et al. (24). Die SDS-Polyacrylamidlösung wurden hergestellt wie von Segrest et al. beschrieben. Bei Eistemperatur wurde diese in Kunststoffformen (Dimension 0,5 x 20 x 8,5 cm) gegossen, in welchen Auftragsspalten (Volumen 20 µl) vorgeformt waren. Die polymerisierten Gele wurden dann mindestens 24 hrs mit Elektrophorese-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 1% SDS, pH 8) äquilibriert. Das zu trennende Protein wurde in einer Konzentration von 50 - 150 µg/20 µl in SDS-haltigem Puffer gelöst (vgl. 2.2.2.) und aufgetragen. Nachdem alle Proteine bei einer Feldstärke von 5 Volt/cm in das Gel eingewandert waren, wurde die Feldstärke auf 15 Volt/cm erhöht. Das Gel wurde beidseitig gekühlt (12⁰ C).

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den Gelen wurden diese in 1 x 10 mm dicke Scheiben geschnitten. Die

Gelscheiben wurden dann in 0,5 ml Elektrophorese-Puffer 12 hrs bei 60° C in Scintillatorzählflaschen inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 8 ml Scintillationsflüssigkeit (Carl Roth AG.) hinzugefügt und in einem Searle-Nuclear Chicago-Scintillationszähler die Radioaktivität bestimmt (Zählausbeute für Tritium ca. 28%. Die Eichung der SDS-Gele für Molekulargewichtsbestimmungen erfolgte durch Parallel-
lauf von Eichsubstanzen. Es wurden folgende Proteine verwendet:

- Ferritin aus Pferdemilz (MG der Untereinheiten bei 220 000 und 18 500),
- Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (MG der Untereinheit bei 94 000),
- Albumin aus Rinderserum (MG 67 000),
- Ovalbumin aus Hühnerei (MG 43 000),
- Lactatdehydrogenase aus Rinderherz (MG der Untereinheit bei 36 000),
- Trypsininhibitor aus Sojabohnen (MG 20 000),
- Cytochrom C aus Pferdeherz (MG 11 500).

(alle Substanzen außer Cytochrom C von Pharmacia Fine Chemicals, Calibration Kit).

Das Färben der Proteine mit Coomassie Blue und der Glykoproteine nach der PAS (Perjodsäure-Schiff)-Methode erfolgte jeweils nach dem von den erwähnten Autoren angegebenen Verfahren (vgl. auch Text). Densitogramme (bei 578 nm) wurden mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers aufgezeichnet, der für diesen Zweck umgebaut worden war. Zum Nachweis enzymatisch aktiver α -Glucosidase wurde das Gel zunächst ca. 1/2 hr in Acetat Puffer (0,1 M, pH 4) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde neuer Puffer zugesetzt in dem zuzüglich 5 mM MUF-Glu vorhanden waren. Nach 10 min. Inkubation bei 37° C wurde der Puffer entfernt, das Gel mit Wasser kurz gewaschen und in Nacarbonat Puffer gelegt (vgl. 2.2.2.). Mit einer Lichtquelle (365 nm) konnten aktive Enzymbanden beobachtet werden.

4.5. Herstellung von Antikörper gegen α -Glucosidase

Die Antigen-Präparation (Fraktion F_1) wurde mit Freund's Adjuvans gemischt und in Kaninchen injiziert.

Impfschema:

1. Impfung: 2 mg Enzym intrakutan an 20 Stellen auf dem Rücken, ferner 2 mg subcutan an 5 Stellen (beidesmal Freund's Adjuvans komplett)
2. Impfung nach 10 Tagen: 2 mg Enzym an 5 Stellen subkutan (Freund's Adjuvans komplett), 2 mg Enzym intramuskulär an 4 Stellen (Freund's Adjuvans inkomplett) und 1 mg Enzym intravenös (Ohrvene, Enzym war in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst),
3. und 4. Impfung jeweils nach weiteren 10 Tagen, Ablauf wie bei 2. Impfung.

8 - 10 Tage nach der 4. Impfung wurde dem Kaninchen 1 ml Blut entnommen. Das Serum wurde mit Hilfe des Ouchterlony Tests (35) untersucht. Lag die unterste Nachweisgrenze des Antiserums (d.h. ohne IgG-Anreicherung) bei ca. 0,2 ug Antigen, so wurde der Hase in Narkose am Tage nach der Blutprobenentnahme entblutet. Wenn das Serum diese Voraussetzung nicht erfüllte wurde nochmals Antigen injiziert (vgl. 2. Impfung). Bisher war erst einmal eine 5. Impfung notwendig. Kontrollseren wurden von jedem Kaninchen vor der ersten Impfung mit Antigen durch Abnahme von 10 ml Blut oder durch Herstellung eines Antiserums gegen Rinderserumalbumin gewonnen.

Zur Titerbestimmung wurden jeweils 50 ug Enzym mit steigenden Mengen an Antiserum behandelt. Der Protein-gehalt des entstehenden Immunopräzipitats wurde bestimmt und somit der Titer ermittelt. Die Immunopräzipitationsmethoden sowie die Bedingungen der SDS-gelelektrophoretischen Analyse der Immunopräzipitate sind im Ergebnisteil detailliert aufgeführt. (Bei Unklarheiten

bei Werner (29) oder von Rücker (36) nachschlagen). Zur Herstellung von Antikörper gegen SDS-desintegriertes Enzym wurde das intakte Enzym zunächst mit SDS-haltigem Puffer (0,1 M Tris-HCl, 2% SDS, pH 8) vermischt. Dabei wurde darauf geachtet, daß das Enzymprotein mit einem Überschuß an SDS (1:5; w/w) ca. 1 hr bei 37° C inkubiert wurde. Anschliessend wurde das überschüssige SDS durch Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung entfernt und wie oben angegeben als Antigen verwendet.

4.6. Fibroblasten: Kulturbedingungen, radioaktiver Einbau

Human Fibroblasten wurden in Ham's F-10 Medium (Gibco) gezüchtet, welches 20% Kälberserum enthielt. Die Zellkulturen wurden jeweils bis zur Konfluenz in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ gezüchtet und anschliessend je nach Bedarf öfters subkultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Subkulturen mit annähernd gleich viel Zellen angesetzt wurden. Die radioaktive Markierung mit 3-H Leucin (40 - 60 Ci/mMol, New England Nuclear Chemicals) wurde nach erneuter Konfluenz (etwa 8 Tage nach Subkultur) vorgenommen. Dabei wurde zunächst frisches Kulturmedium zugesetzt und nach 24 hrs mit 500 uCi 3-H Leucin weitere 24 hrs radioaktiv markiert. Bei Chase-Experimenten wurden die Fibroblasten anschliessend nochmals 48 hrs bei 5% Leucin-Sättigung weiterkultiviert.

Zur Bestimmung des radioaktiven Einbaus und für weitere Untersuchungen wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers aus dem Zuchtfläschchen entfernt und zunächst 3 - 4 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen mit wenig Wasser suspendiert und mit Ultraschall (vgl. Text) aufgebrochen. Eine aliquote Menge des Homogenats wurde jeweils auf Whatman-Glasfaserfilter (Durchmesser 2,5 cm) pipettiert, die mit 10% TCA-Äther imprägniert waren. Die Glasfaserfilter wurden dann wie folgt behandelt:

2 mal mit 5% TCA bei Zimmertemperatur, einmal 10 min mit 5% TCA bei 90° C, 2 mal 3 min. mit 5% TCA bei Zimmertemperatur, 2 mal mit Äther/Äthanol (1:1), und einmal mit Äther. Die Filter wurden dann getrocknet und mit 0,5 ml Elektrophorese Puffer (vgl. 4.4.) in Scintillationszählflaschen bei 60° C eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe von Scintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität bestimmt.

4.7. Aminosäureanalysen

Salzfreie Enzymproben (DEAE-Cellulose Fraktion, vgl. 2.2.3.) von etwa 0,2 mg wurden in 1 ml bidestillierter, konstant siedender HCl gelöst, unter Stickstoff auf etwa 1 Torr evakuiert, in einem Glaskolben eingeschmolzen und bei $110 \pm 1^\circ \text{C}$ hydrolysiert. Die Hydrolysedauer betrug 48 hrs. Das Hydrolysat wurde am Technicon-Auto-analysator (Fa. Technicon, Frankfurt/M.) im Einsäulenmikroverfahren analysiert.

4.8. Verwendete Materialien

3-H (4,5)Leucin (40 - 60 Ci/mMol): NEN, New England Nuclear Chemicals GmbH.

Sephadex G-100, Sephacryl S-200, Epoxy-aktivierte Sepharose 6-B, Calibration-Kit mit Protein-Eichsubstanzen für die Gelchromatographie und Elektrophorese, Protein-A-Sepharose CL-4B: Deutsche Pharmacia GmbH.

4-Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosid, 4-Methylumbelliferon, Turanose, Humanalbumin, Triton X-100: Sigma Chemical Co., Deutsche Niederlassung München.

Cytochrom C, NADP⁺, NADPH, Hexokinase aus Hefe, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase: Boehringer, Mannheim.

SDS, Coomassie-Blue, Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyl-äthylendiamin, DEAE-Cellulose (Serval DEAE 23 SS): Serva GmbH, Heidelberg.

Freund's Adjuvans: Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.

Agarose: Behring-Werke.

Ampholine: LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden.

Ham's F-10 Medium: Gibco, U.S.A.

Scintillationslösung I: Carl Roth, Karlsruhe.

Maltose, Tris-HCl, EDTA, Veronal-Na, Na-acetat, Harnstoff, TCA, Dansyl-chlorid, Ameisensäure, Essigsäure, Aceton, Äthanol, Äthylacetat, Methanol, Salzsäure, Na-chlorid, K-chlorid, Saccharose, Perjodsäure, Schiffssches Reagenz (p.A. Qualität): Merck AG, Darmstadt.

DC-Fertigfolie, F 1700 Mikropolyamid, Nr. 356000: Schleicher & Schüll.

5. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Cyto C	Cytochrom C
DEAE	Diäthylaminoäthyl
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
MG	Molekulargewicht
MUF	4-Methylumbelliferon
MUF-Glu	4-Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

6. Literatuurverzeichnis

1. Pompe, J.C., Ned. Tijdsch. Geneeskunde 76, 304-311 (1932)
2. Baudhuin, P., Hers, H.G. & Loeb, L., Lab. Invest. 13, 11-39-1152 (1964)
3. Hers, H.G., Biochem. J. 86, 11-16 (1963)
4. Di Sant'Agnese, P.A., Anderson, D.H., Mason, H., & Bauman, W., Pediatrics 6, 607-624 (1950)
5. Engel, A.G., Brain 93, 599-616 (1970)
6. Hodgson, S., Gardner-Medwin, D., Worsfold, M., Pennington, R.J.T., & Walton, J.N., Brain 91, 435-462 (1968)
7. Mehler, M., & DiMauro, S., Neurology 27, 178-184 (1977)
8. DiMauro, S., Stern, L.Z., Mehler, M., Nagle, R.B., & Payn, C., Muscle & Nerve 1, 27-36 (1978)
9. Reuser, A.J.J., Koster, J.F., Hoogeveen, A., & Galjaard, H., Am. J. Hum. Genet. 30, 132-143 (1978)
10. Murray, A.K., Brown, B.I., & Brown, D.H., Arch. Biochem. Biophys. 185, 511-524 (1978)
11. Bruni, C.B., Aurricchio, F., & Cevelli, I., J. Biol. Chem. 244, 4735-4742 (1969)
12. Jeffrey, P.L., Brown, D.H., Brown, B.I., Biochemistry 9, 1403-1415 (1970)
13. Palmer, T.N., Biochem. J. 124, 701-711 (1971)
14. DeBarys, T., Jacquemin, P., Devos, P., & Hers, H.G., Eur. J. Biochem. 31, 156-165 (1972)
15. Belenky, D.M. & Rosenfeld, E.L., Clin. Chim. Acta 60, 397-400 (1975)
16. Koster, J.F., Slee, R.G., van der Klei-van Moorsel, J.M., Rietra, P.J.G.M., & Lucas, C.J., Clin. Chim. Acta 68, 49-58 (1976)
17. Nitowsky, H.M. & Grunfeld, A., J. Lab. Clin. Med. 69, 472-484 (1967)
18. Salafsky, J.S. & Nadler, J., J. Pediat. 79, 794-798 (1971)
19. Niermeijer, M.F., Koster, J.F., Jahodova, M., Fernandes, J., Heukels-Dully, M.J., & Galjaard, H., Pediat. Res. 9, 498-503 (1975)
20. von Rücker, A., Schaub, J. unpublished results

21. Lejeune, N., Thinès-Sempoux, D., & Hers, H.G., Biochem.J. **86**, 16-21 (1963)
22. Bloemendal, H. in Acrylophor-Instructions, Pleuger SA, Wijnegem, Belgium
23. Winter, A., Ek, K., & Anderson U.-B., LKB-Application Note 250, LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden (1977)
24. Segrest, J.P., Jackson, R.L., Methods of Enzymology Vol. 28, 54-63
25. Hartley, B.S., Biochem.J. **119**, 805 (1970)
26. Hirs, C.H.W., Methods of Enzymology Vol. 11, 197-199
27. Weber, K., Pringle, J.R., & Osborn, M., Methods of Enzymology Vol. 26, 3-27
28. Forsgren, A. & Sjöquist, J., J. Immunol. **97**, 822-827 (1966)
29. Werner, S. & Machleidt, W., Eur.J.Biochem. **90**, 99-105 (1978)
30. Shin-Bühning, Y.S., Drefers, M., Kröner, H., Osang, M., & Schaub, J., Clin.Chim.Acta **89**, 393-404 (1978)
31. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., J.Biol.Chem. **193**, 265-275 (1951)
32. Galjaard, H., Reuser, A.J.J., Heukels-Dully, M.J., Hoogeveen, A., Keijzer, W., de Wit-Verbeek, H.A., & Niermeijer, M.F. in "Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases" eds. Tager, J.M., Hooghwinkel, G.J.M. & Daems, W.T.L., p. 35-51 (North Holland Publ.Co. Amsterdam)
33. Koster, J.F., Slee, R.G., Hülsmann, W.C., & Niermeijer, M.F., Clin.Chim.Acta **40**, 294-297 (1972)
34. Hirschborn, K., Nadler, H.L., Waithe, W.I., Brown, B.I. & Hirschborn, R., Science **166**, 1632-1633 (1969)
35. Duchterlony, D. in "Progress in Allergy" ed. Kallos, P., Vol. 5, p. 1, Karger, Basel
36. von Ruecker, A., Dissertationsschrift, Fachbereich Chemie & Pharmacie, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1975)
37. Schram, A.W., Brouwer-Kelder, B., Donker-Koopman, W.E., Loonen, C., Hamers, M.N., & Tager, J.M., Biochem.Biophys. Acta (submitted)
38. Swallow, D.M., Corney, G., Harris, H., & Hirschborn, R., Ann.Hum.Genet.Lond. **38**, 391 (1975)
39. Koster, J.F. & Slee, R.G., Biochim. Biophys. Acta **482**, 89-97 (1977)

40. Soyama, K., Ono, E., Shimada, N., Tanaka, K., Oya, N., & Kusunoki, T., Clin. Chim.Acta 78, 473-478 (1977)
41. Bruni, C.B., Sica, V., Aurricchio, F., & Covelli, I., Biochim. Biophys.Acta 212, 470-477 (1970)
42. Hickman, S. & Neufeld, E.F., Biochem.Biophys.Res.Comm. 49, 992-999 (1972)
43. Reuser, A., Halley, D., deWit-Verbeek, H., Hoogeveen, A., van der Kamp, M., Mulder, M., & Galjaard, H., Biochem. Biophys.Res.Comm. 69, 311-318 (1976)
44. Reuser, A.J.J., Jongkind, J.F., & Galjaard, H., J.Histochem.Cytochem. 24, 578-586 (1976)
45. Cotton, R.G.H. & Danks D.M., Nature 260, 63-64 (1976)
46. Aronsson, T. and Grönwall, A., Scand.J.Clin.Lab.Invest 9, 338 (1957)

Lebenslauf

Am 6. Juli 1943 wurde ich als viertes und letztes Kind des Nicolaus von Rücker - Diplom-Ingenieur - und seiner Ehefrau Ilse, geborene Carstens, in München geboren. 1948 wanderten meine Eltern nach Kanada aus. In Montreal besuchte ich von 1949 - 1951 die Elementary School, die der deutschen Volksschule entspricht. 1951 siedelten wir nach U.S.A. um. In South Bend, Indiana bestand ich 1953 die Aufnahmeprüfung in die High-School, die ich bis 1956 besuchte. 1956 zogen meine Eltern zurück nach Deutschland. In Stuttgart besuchte ich von 1956-1962 verschiedene private und staatliche Schulen. 1962 kamen wir zurück nach München. Hier bestand ich an der Rupprecht-Oberrealschule 1964 das Abitur. Ich studierte zuerst bis 1967 Rechtswissenschaften in Berlin und München (Abschluß als cand. jur.). Im Wintersemester 1967/68 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Technischen Hochschule in München. Acht Semester später legte ich die Diplom-Chemikerhauptprüfung ab. Meine biochemische Diplomarbeit fertigte ich unter der Anleitung von PD Dr. H. Tschesche am Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule München an.

Von 1972 - 1976 promovierte ich auf dem Gebiet der physiologischen Chemie am Institut für Physiologische Chemie, Physikalischer Biochemie und Zellbiologie der Universität München bei Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher. 1976 - 1977 arbeitete ich an Problemen des Nukleotidstoffwechsels am Physiologischen Institut der Universität München (Arbeitskreis PD Dr. H. Zimmer) mit einem kurzen Studienaufenthalt an der University of Chicago (Arbeitskreis Prof. Dr. R. Zak). Seit 1973 studierte ich zusätzlich Medizin, die ich im November 1979 mit der Approbation als Arzt abgeschlossen habe. Die vorliegende Dissertationsschrift entstand an der Kinderklinik der Universität München (Direktor Prof. Dr. K. Betke) von Juli 1977 bis März 1979 im Arbeitskreis von PD Dr. J. Schaub.

